Aus dem Strahlenbiologischen Institut der Universität München
und dem Institut für Biologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung in Neuherberg bei München.

(Leiter Professor Dr. med. O. H u g)

MIKROAUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINBAU UND DIE RETENTION VON CALCIUM - 45 IM KNIEGELENK DER RATTE NACH LOKALER RÖNTGENBESTRAHLUNG MIT 2000 R.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität München

vorgelegt von

Johann Kummermehr

aus München

München 1971

1972

Aus dem Strahlenbiologischen Institut der Universität München
und dem Institut für Biologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung in Neuherberg bei München.

(Leiter Professor Dr. med. O. H u g)

MIKROAUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINBAU UND DIE RETENTION VON CALCIUM - 45 IM KNIEGELENK DER RATTE NACH LOKALER RÖNTGENBESTRAHLUNG MIT 2000 R.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität München

vorgelegt von

Johann Kummermehr

aus München

München 1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. O. Hug
Mitberichterstatter:	—
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.2.1972

INHALTSÜBERSICHT

Seite

EINLEITUNG 1

MATERIAL, VERSUCHSANORDNUNG, METHODEN 3

ERGEBNISSE

I. Histopathologie des bestrahlten Knochens 6
A. Literaturübersicht 6
B. Eigene Ergebnisse 9

II. Autoradiographische Untersuchungen über den Einbau von ^{45}Ca 15
A. Das Verteilungsmuster von ^{45}Ca im unbestrahlten Kniegelenk 16
B. Altersbedingte Veränderungen im normalen Verteilungsmuster 18
C. Der ^{45}Ca-Einbau im bestrahlten Kniegelenk 21

III. Autoradiographische Untersuchungen über die Retention von inkorporiertem ^{45}Ca 31
A. Knochenwachstum und Retentionsmuster im unbestrahlten Kniegelenk 31
B. Verlauf des Retentionsmusters im bestrahlten Kniegelenk 4o

IV. Orientierende Untersuchungen über die Retention von ^{45}Ca nach Inkorporation in den bereits strahlengeschädigten Knochen 46

V. Veränderungen des ^{45}Ca-Einbaus in der Frühphase der Strahlenschädigung 49

VI. Verhalten der außerhalb des Strahlenfeldes gelegenen Epimetaphysen 53

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

I. Einfluß der Strahlenschädigung auf den ^{45}Ca-Einbau.. 57
1. Schädigung der osteoblastischen Aktivität 57
2. Atypische Knochenneubildung 6o
3. Histologische Reparation 61
4. ^{45}Ca-Affinität von präformiertem Knochengewebe .. 64

5. Verkalkung des Epiphysenfugenknorpels..... 66
6. Vergleich der autoradiographischen Ergebnisse mit quantitativen Stoffwechseluntersuchungen 69

II. Strahleninduzierte Wachstumsstörungen und ihre Bedeutung für den Mineralumsatz 73

1. Strahlenempfindlichkeit des Längenwachstums 73
2. Störungen im physiologischen Knochenumbau 75
3. Strukturgebundenheit des Calcium-Umsatzes 77
4. Strukturerneuerung der Epiphysenspongiosa 8o

ANHANG: MIKROTECHNISCHE UND AUTORADIOGRAPHISCHE METHODIK.. 83

1. Präparation der Knochen und Vorbehandlung 83
2. Einbettung in Methylacrylat 85
3. Herstellung der Schnitte 88
4. Autoradiographie 91
5. Färbung der nicht zur Autoradiographie verwendeten Schnitte 95

ZUSAMMENFASSUNG 98

LITERATURVERZEICHNIS 1oo

BILDANHANG 1o8

LEBENSLAUF 131

EINLEITUNG

Seit den klassischen Arbeiten von Perthes 1904 (55) und Försterling 1906 (24) über den schädigenden Einfluß der Röntgenstrahlen auf das Skelett sind die Wirkungen ionisierender Strahlen im Knochen eingehend untersucht worden. Als ausgesprochen organspezifische Leistung stellte der Mineralstoffwechsel in diesem Zusammenhang für die Strahlenbiologie einen wichtigen Parameter dar. Seine grundsätzliche Strahlenempfindlichkeit war aus röntgenologischen und feingeweblichen Veränderungen bereits relativ früh bekannt, die eigentliche Funktionsstörung, die darin zum Ausdruck kommt, jedoch erst sehr viel später einer quantitativen Untersuchung zugänglich.
Aus der Sicht der klinischen Radiologie besitzt die Betrachtung dieser Störungen durchaus auch praktische Bedeutung. Die unvermeidbare Mitbestrahlung von Skeletteilen bei der Tumorradiotherapie veranlaßt nicht selten gravierende Spätschäden am Knochen wie Osteoporose, herdförmige Demineralisierung und Sklerosierung, Osteonekrose und radiogene Fraktur. Diese Krankheitsbilder zeichnen sich durch pathognomonische Störungen im Kalkhaushalt aus, wobei dem röntgenmorphologisch faßbaren Befund stets langfristige Veränderungen in der Dynamik des Mineralstoffwechsels vorausgehen.

Die tierexperimentelle Forschung auf diesem Gebiet erlebte einen entscheidenden Durchbruch mit der Einführung der tracer-Technik und der Anwendung osteotroper Radionuklide wie ^{32}P, ^{45}Ca und ^{89}Sr. In ersten orientierenden Untersuchungen am bestrahlten Knochen konnten Marinelli und Kenney bereits 1941 (48) und Hinkel 1942 (36) nachweisen, daß der Einbau und die Elimination von markiertem Phosphat in den Extremitätenknochen der Maus durch eine lokale Bestrahlung mit 3000 R stark gehemmt werden. Spätere systematische Untersuchungen von Wilson (70, 71), Zuppinger und Minder (76), Kolar und Babicky (45) und Gauwerky (27) befaßten sich vorwiegend mit der Aufnahme von ^{32}P und ^{45}Ca in das Kniegelenk von Ratte und Maus. Für den zeitlichen Verlauf nach Dosen von 1500 bis 3000 R ergab sich, daß der Nuklideinbau zunächst rasch absinkt und innerhalb von 3 bis 5 Wochen ein Maximum der Depression durchläuft, dem sich ein Wiederanstieg der Einbaurate auf zeitlebens subnormale Werte anschließt. Die Tat-

sache, daß die initiale Depression auch nach Dosen bis 6000 R einen Grenzwert von 50 bis 60 % nicht übersteigt, ist dabei als Hinweis gewertet worden, daß verschiedene Einbaumechanismen mit sehr unterschiedlicher Strahlenempfindlichkeit vorliegen (77). In Untersuchungen über die Beeinflußbarkeit des Mineralkatabolismus konnten Gauwerky (27) sowie Kolar und Babicky (43, 44) ferner zeigen, daß die Retention von bereits inkorporiertem ^{45}Ca im Kniegelenk der Ratte durch lokale Bestrahlung mit 750 bis 5000 R dosisabhängig erhöht wird. Im Zusammenhang mit der Einbauhemmung muß daraus auf eine Drosselung des Mineralumsatzes im bestrahlten Knochen geschlossen werden. Diese Annahme konnten Finston, Woodard und Laughlin (23) in Doppel-tracer-Versuchen mit ^{47}Ca und ^{85}Sr am Röhrenknochen des Hundes experimentell bestätigen.

Den besprochenen Ergebnissen liegen im wesentlichen Aktivitätsbestimmungen an veraschten Knochenproben, vereinzelt auch intravitale Messungen zugrunde. Sie vermitteln daher ein Bild vom Verlauf der Strahlenreaktion, das jeweils das integrale Verhalten des ganzen Knochens oder zumindest größerer Knochenabschnitte kennzeichnet. Im Hinblick auf die differenzierte anatomische und funktionelle Gliederung des Knochens ergibt sich der Einwand, daß die zu erwartenden lokalen Unterschiede der Strahlenwirkung dabei unberücksichtigt bleiben.

Die vorliegende Arbeit hat sich daher die Aufgabe gestellt, die durch eine höhere Einzeldosis ausgelösten Störungen im ^{45}Ca-Metabolismus des Knochens erstmals mikroautoradiographisch, d.h. in ihrem räumlichen Schädigungsmuster zu erfassen. Als Versuchsobjekt wurde das Kniegelenk der adulten, noch wachsenden Ratte gewählt. Neben den angeführten Stoffwechselstudien ist hieran vor allem der Schädigungsverlauf aus morphologischer Sicht bereits ausführlich untersucht worden (z.B. 5, 17, 21, 25, 38), vereinzelt auch das Enzymmuster der alkalischen und sauren Phosphatase (29). Die strukturbezogene autoradiographische Betrachtung erscheint uns besonders geeignet, die unter so verschiedenartigen Gesichtspunkten erarbeiteten Ergebnisse zu ergänzen und in ihrem pathogenetischen Zusammenhang deutlicher zu machen.

MATERIAL, VERSUCHSANORDNUNG, METHODEN

Die Versuche wurden an erwachsenen männlichen Wistarratten durchgeführt, die mit Standardfutter Altromin (Firma Altrogge, Lage) und Wasser gehalten wurden. In Vorversuchen waren zum Teil auch Sprague-Dawley-Ratten verwendet worden, ohne daß sich im Verhalten beider Stämme wesentliche Unterschiede ergeben hätten.

Für alle Versuchsserien wurden die Tiere am rechten Kniegelenk mit 2000 R bestrahlt, wenn sie ein Gewicht von 245-255 g erreicht hatten, was einem Lebensalter von ca. 8 Wochen entsprach. Nach Cohn und Gong (19) wird der Reifegrad des Skeletts in dieser Altersklasse besser durch das Körpergewicht definiert als durch das genaue Lebensalter.

Die Bestrahlung erfolgte mit dem Röntgengerät MG 300 der Firma C.H. Müller bei einer Spannung von 300 kV, einem Röhrenstrom von 10 mA und Filterung durch 0.3 mm Cu. Im Fokus-Hautabstand 32.5 cm betrug die Dosisleistung - gemessen als Luftdosis mit dem Victoreen-Dosimeter während der Bestrahlung - rund 145 R/min die HWS der Strahlung 2.4 mm Cu.

Zur Bestrahlung wurden die Tiere mit Nembutal narkotisiert und auf einer hölzernen Grundplatte fixiert, die bis zu drei Ratten gleichzeitig aufnehmen konnte. Die genaue Lagerung der Kniegelenke in vorgegebenen Feldern erfolgte durch einstellbare Halterungen aus gebogenen Plexiglasstreifen. Zur Abschirmung diente eine 5 mm starke Bleiplatte, in die im gleichen Abstand vom Zentralstrahl 4 Bohrungen von 25 mm Durchmesser zur Ausblendung der Bestrahlungsfelder für die Kniegelenke und das Dosimeter eingelassen waren. Um die Streuung an der Bleiabschirmung möglichst gering zu halten, waren diese Bohrungen schräg, mit genauer Zentrierung der Bohrachse zum Röhrenfokus hin durch die Bleiplatte geführt.

Unmittelbar nach der Bestrahlung wurde ohne Veränderung der Position durch Einlegen einer Kassette unter die Grundplatte eine Röntgenaufnahme angefertigt, um die genaue Lage von Tibia und Femur im Bestrahlungsfeld festzuhalten. Die Tibia war durchschnittlich mit 12 mm, der Femur mit 14 mm erfaßt; die genaue Kenntnis der Bestrahlungsgrenze war für den Vergleich mit der histologischen Schädigungsgrenze im Knochen später von großem Wert.

Nach der Bestrahlung stellten sich die üblichen Hautveränderungen wie Erythem, Epilation und Erosion ein. Meist kam es zur Abheilung mit dünner Wiederbehaarung innerhalb von 6 bis 10 Wochen, in einigen Fällen blieben auch hartnäckige Erosionen und Ulcerationen bestehen. Der Allgemeinzustand der Tiere war in der Regel gut.

Zur weiteren Behandlung wurden die Tiere in 4 Gruppen aufgeteilt:

Gruppe A: 30 Tiere, die 1,2,3,4,6,9,12,15,19 und 22 Wochen p.irr. getötet wurden. sowie weitere 4 Tiere, die zwischen 16. und 19. Monat p.irr. getötet wurden. Die Injektion von ^{45}Ca erfolgte jeweils 48 Stunden vor dem Tod. Diese Gruppe diente der Untersuchung des Ca-Einbaus zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung.

Gruppe B: 6 Tiere, die unmittelbar nach Bestrahlung mit ^{45}Ca markiert und 1,2,3,4,6 und 9 Wochen später getötet wurden. Der Versuch zeigt die Verschiebung und Veränderung des Aktivitätsmusters in der Zeit nach Inkorporation und gibt damit Aufschluß über die Störung von Wachstums- und Umbauvorgängen.

Gruppe C: 2 Tiere, die für eine spezielle Fragestellung 5 Wochen p.irr. markiert und 2 bzw. 4 Wochen später getötet wurden.

Gruppe D: 4 Tiere, die 24 Stunden ante mortem markiert und 1,2,3 und 4 Tage p.irr. getötet wurden. In Ergänzung zu Gruppe A wurden damit die Frühveränderungen im Ca-Einbau erfaßt.

Die Markierung der Tiere mit ^{45}Ca (als Chlorid in wäßriger Lösung) [1] erfolgte durch Injektion in die Schwanzvene, und zwar entweder in kurzem Ätherrausch oder bei der Gruppe B noch in der Bestrahlungsnarkose. Als Dosierung wurden 100 μ Ci/300 g Körpergewicht gewählt; die Restaktivität ist damit mehrere Monate nach Injektion noch so hoch, daß 4 bis 6 wöchige Expositionszeiten eine gute autoradiographische Darstellung gewährleisten.

---

1) Hersteller: Radiochemical Center, Amersham, England
Spezifische Aktivität 4-6 Ci/g Ca

Eine ausführliche Beschreibung der mikrotechnischen Aufarbeitung findet sich im Anhang (S. 83 ff.). Für die Besprechung der Ergebnisse sei vorweggenommen, daß unentkalkte 5 µ dicke Knochenschnitte mit AR 10 Stripping Film autoradiographiert und mit Hämalaun gefärbt wurden. Zur genaueren morphologischen Untersuchung wurden außerdem nicht autoradiographierte Schnitte mit Hämalaun-Eosin, Alcianblau-Pikrofuchsin sowie nach Giemsa gefärbt.

ERGEBNISSE

I. Histopathologie des bestrahlten Knochens.

Die im bestrahlten Knochen ablaufenden histologischen Veränderungen stellen das morphologische Substrat für autoradiographisch nachweisbare Veränderungen des Ca-Stoffwechsels dar und verdienen daher eine ausführliche Betrachtung. Bevor jedoch auf die eigenen Befunde eingegangen wird, soll eine kurze Zusammenstellung aus der Literatur einen Überblick über die nach lokaler Bestrahlung in höherer Dosierung zu erwartenden Veränderungen vermitteln. Der Vergleichbarkeit kommt zugute, daß die entsprechenden Untersuchungen bevorzugt am Kniegelenk der Ratte und zwar meist im Dosisbereich 1500 bis 3000 R durchgeführt worden sind.

A. Überblick über den Schädigungsverlauf anhand von Literaturergebnissen.

1. Die ersten sichtbaren Veränderungen spielen sich, vom Knochenmark abgesehen, an der Epiphysenfuge ab. Bei Dosen über 1000 R kommt es 1 bis 2 Tage nach Bestrahlung, bei jungen Tieren offenbar noch eher, zu Schwellungen und Nekrosen der Chondrocyten. Am Ende der 1. Woche ist die Zellzahl bereits stark vermindert und die Organisation der Knorpelfuge in einzelne Zellschichten weitgehend aufgehoben; die Knorpelarrosion ist durch die Gefäßdegeneration in der Eröffnungszone deutlich beeinträchtigt und die Längsrichtung der verkalkten Knorpelbälkchen beginnt sich zu verwirren (5,8,11,27,38,51). Bald kommt es zu einem charakteristischen Bild, das über längere Zeit ohne wesentliche Änderung bestehen bleibt: Die verdickte Knorpelfuge enthält spärliche pyknotische Chondrocyten in stark erweiterten Höhlen; zur Metaphyse hin erfolgt der Abschluß durch eine knöcherne Platte, die häufig keine Verbindung zur Spongiosa mehr besitzt (5,25,27,31). Da zu dieser Zeit kaum mehr Osteoblasten vorhanden sind, ist auch eine direkte Metaplasierung von Knorpel in Knochengewebe im Bereich dieser Knochenplatte in Betracht gezogen worden (31,41,51). Im allgemeinen führen Dosen über 1500 - 1800 R in der 1. bis 2. Woche p.irr. zur irreversiblen Einstellung des Längenwachstums (21,65). Unabhängig davon bildet der weniger geschädigte Ruheknorpel nach der 4. Woche sehr häufig kugelige Regenerate, die als Inseln im devitalisierten Knorpel liegen bleiben und keine

Ausrichtung in Zellsäulen erkennen lassen (5,11,25,65). Größere, in Zellsäulen organisierte Regenerate können Anschluß an die Markhöhle der Metaphyse gewinnen, wenn der devitalisierte Knorpel durch Gefäßinvasion von der Peripherie der Epiphysenfuge aus resorbiert wird. Nicht selten führt dieser Vorgang sogar zur Aufspaltung und Verdoppelung der Knorpelplatte, wobei der proximale Teil wieder einen Beitrag zum Längenwachstum leisten kann (6,8,17,25). Im übrigen wird die wachsende Epiphysenfuge als eines der strahlensensibelsten Gewebe überhaupt betrachtet und ihre Wachstumsleistung häufig zur Untersuchung quantitativer Dosiswirkungsbeziehungen herangezogen (21,27, 32,65).

2. Vom Knochengewebe selbst entwickelt vor allem die Spongiosa der Metaphyse infolge ihrer lebhaften Umbautätigkeit und Knochenneubildung ausgedehnte Veränderungen. Bald nach Bestrahlung findet man trotz des raschen Untergangs der Osteoblasten röntgenologisch wie histologisch eine Verdichtung der Metaphyse (8,11,25,38,41,51), die wahrscheinlich auf einer Hemmung der Osteoklasie beruht. Sie ist auch bei jungen Hunden 1 bis 2 Tage nach 2000 R in der distalen Radiusmetaphyse beobachtet worden (4). Während im weiteren Verlauf der reguläre Knochenanbau nach solchen Dosen bald zum Erliegen kommt, setzen abnorme Neubildungen von Knochengewebe, die unter dem Begriff der "atypischen" oder "fibrösen Knochenbildung" zusammengefaßt werden, die Sklerosierung fort. In ihrer histologischen Struktur sind sie recht uneinheitlich; häufig dient ihnen die starke Vermehrung kollagener Fasern, die vor allem peritrabekulär beobachtet wird, als Grundlage (6,8,17,21,27,33). Die auffallende Basophilie dieser Knochenform soll auf ihrem vermehrten Zement- und damit Mucopolysaccharidgehalt beruhen (6). Neben den Sklerosierungen, die über Monate bestehen bleiben können, werden auch Demineralisationsherde, osteoporotische Bilder, ja sogar Destruktionen ganzer Knochenteile bei Ratte und Maus beobachtet (17,41,6o). Späte Reparationen der sklerotischen Veränderungen scheinen allerdings häufig zu sein.

Die Epiphyse zeigt meist ein ähnliches Bild. Sie ist wie die Metaphyse bevorzugter Ausgangsort für osteogene Sarkome, wobei die Latenzzeit bei der Ratte mit mindestens 7 Monaten nach 3000 R angegeben worden ist (6,8).

3. Der corticale Knochen reagiert im Vergleich zur Spongiosa relativ geringfügig. Er kann an seiner Markseite an den produktiven Veränderungen teilnehmen, wobei auch hier das normale appositionelle Wachstum durch eine mehr interstitielle Knochenbildung ersetzt ist (51). Osteolyse und Spontanfrakturen werden bei der adulten Ratte nach 2000 R meist vermißt und kommen allenfalls bei sehr jungen Tieren vor. Die Osteocyten erweisen sich als auffallend strahlenresistent und zeigen beispielsweise bei der Ratte auch nach 6000 R nur geringfügige lichtmikroskopische Veränderungen (59). Erst wenn durch Verödung der in den Knochenkanälchen verlaufenden Gefäße eine Ischämie eintritt, können auch sie zugrunde gehen. Dabei ist zu beachten, daß Zellen, die im kompakten Knochen liegen, eine wesentlich größere Strahlenbelastung erfahren als in einem homogenen wasseräquivalenten Gewebe, weil der mineralisierte Knochen einen höheren Absorptionskoeffizienten hat und die von ihm ausgehenden Sekundärelektronen zur Strahlendosis dieser Zellen beitragen (14).

4. Knochenmark. Die außerordentliche Strahlensensibilität der hämopoetischen Zellen ist bekannt. Dabei reagiert das Mark auch bei homogener Bestrahlung eines ganzen Röhrenknochens an den Knochenenden, also in der Epi- und Metaphyse am stärksten (33). Das inital rasch entleerte Mark zeigt zunächst deutliche Regeneration, wandelt sich aber nach Dosen von 2000 R und darüber bei der Ratte nach einigen Wochen über ein Stadium der Fettvermehrung in ein aplastisches, gallertig-mucinöses Mark mit dilatierten Sinus um (6,25,33). Fast immer entwickelt sich eine ausgedehnte Fibrose, und zwar zuerst in der Metaphyse und erst später auch in der Epiphyse. Für das Verhalten der Kollagenfasern, die vom Endost der knöchernen Strukturen ausstrahlen und die Trabekel in dichten Bündeln umziehen, ist die treffende Bezeichnung "peritrabekuläre Fibrose" gegeben worden (8). Nach mehreren Monaten kann es allmählich zu endgültiger Reparation kommen, indem sich hämopoetische Markelemente zuerst in der Metaphyse, später auch in der Epiphyse wieder ausbreiten (6,8,27).

5. Die dem Knochen vorgeschalteten extraossär verlaufenden Gefäße sind nach 2000 R bei Ratte und Maus histologisch oder auch funktionell - nach einer Füllung mit Kontrastmittel - oft auffallend geringfügig verändert (39,6o); andererseits kommen im gleichen Versuch (6o) auch so starke Schädigungen vor, daß die

distale Extremität der Nekrose anheimfällt. In den Arterien finden sich in diesem Fall vorwiegend Veränderungen an den inneren Wandschichten (Intimaverdickung, abnorme Lamina elastica), in den Venen ausgedehnte Thrombosierungen.

B. Eigene Ergebnisse.

Die eigenen Befunde, die den Schädigungsverlauf bis zur 22. Woche nach Bestrahlung mit 2000 R umfassen, fügen sich in dieses Bild im wesentlichen ein.

In den ersten Tagen sind deutliche Veränderungen praktisch nur am Epiphysenfugenknorpel (Schwellung und Abnahme der Chondrocyten) sowie im Knochenmark (Stase, Hämorrhagien, ausgedehnter Untergang hämopoetischer Zellen) zu beobachten. 1 Woche p.irr. sind die Veränderungen an der Knorpelfuge so weit fortgeschritten, daß die Anordnung in Zellsäulen nur noch angedeutet besteht. Die Chondrocyten sind etwa auf ein Drittel ihrer normalen Zahl vermindert und zeigen alle Stadien des Zelluntergangs; sie liegen meist in stark erweiterten Knorpelhöhlen. Gleichzeitig mit der Zellproliferation, also dem Knorpelwachstum, scheint auch die Gefäßinvasion und damit die Knorpelarrosion zum Erliegen zu kommen. Eine primäre Spongiosa aus verkalkten Knorpeltrabekeln fehlt daher weitgehend und relativ plumpe Knochbälkchen, die fast bis an die Epiphysenfuge heranreichende, nehmen ihre Stelle ein. Das Knochenmark der Metaphyse enthält kaum noch blutbildende Zellen, dagegen zahlreiche Fibroblasten und erweiterte, gut gefüllte Kapillarsinusoide, die auf eine Stase hindeuten. Osteoblasten und Osteoklasten, die in der unbestrahlten Metaphyse Trabekel und endostale Oberfläche des Schafts überziehen, sind vermindert und nur undeutlich darzustellen.

2 Wochen p.irr. enthält die Knorpelfuge nur noch spärliche pyknotische Chondrocyten, die keinerlei Organisation in verschiedene Zellschichten mehr erkennen lassen. Der Knorpel findet nach unten seinen Abschluß durch eine schmale Zone verkalkter, azellulärer Grundsubstanz, die sich distal in die Knorpelreste der Knochenbälkchen fortsetzt, gegen den hyalinen Knorpel aber scharf abgesetzt erscheint. Diese Verhältnisse werden besonders deutlich durch die selektive Darstellung des verkalkten Knorpels mit Alcianblau erfaßt.

Die Metaphyse wird aus relativ großen, plumpen Trabekeln aufgebaut und weist gegenüber der unbestrahlten Seite nunmehr eine deutliche Zunahme der Knochenmasse auf. Der neugebildete Knochen erscheint histologisch im allgemeinen noch normal, doch treten in der Tibiametaphyse, und zwar in konstanter Lokalisation auf der lateralen Seite des Metaphysenausgangs, erstmals auch unreifere Knochenformen auf. Trotz des weitgehenden Osteoblastenschwundes bildet sich hier rasch ein geflechtartiges, lückenhaftes Knochengewebe, das die laterale Compacta und die ihr vorgelagerten Trabekel miteinander verbindet (Abb. 2,14,15).

An der periostalen Oberfläche des Metaphysenschaftes ist eine deutliche Einschränkung der normalerweise lebhaften Knochenresorption zu beobachten. Die Lakunen der hier aufgereihten Osteoklasten sind verflacht, die Osteoklasten selbst blaß und verwaschen, wenn auch zahlenmäßig noch kaum vermindert.
Hämopoetische Elemente fehlen im Mark der Metaphyse zu diesem Zeitpunkt meist ganz, lediglich subchondral findet sich häufig eine Infiltration von lympho-histiocytären Rundzellen. Mit der van Gieson-Färbung läßt sich eine beginnende Fibrosierung in den Markräumen nachweisen.
3 und 4 Wochen p.irr. Die bestrahlte Knorpelfuge ist jetzt gegenüber der Kontrolle um das 11/2 bis 2-fache verdickt. Auch die den hyalinen Knorpel abschließende verkalkte Knorpelzone ist verbreitert und bildet eine zusammenhängende brüchige Platte mit Einschluß zugeschütteter Chondrocytenhöhlen und hyaliner Knorpelreste (Abb. 3). Kleine, kugelige Knorpelzellregenerate entwickeln sich in der devitalisierten Epiphysenfuge von der 4. Woche p.irr. an.
In der Metaphysenspongiosa nehmen die Trabekel durch unregelmäßige Auflagerung von stark basophilem Knochengewebe allmählich bizarre, ausgezackte Formen an und erfahren eine zunehmende Vernetzung. Auch die Compacta verdickt sich im metaphysären Bereich durch Auflagerung von grobfibrösem Knochengewebe, zumal unter dem Periost mit der 4. Woche p.irr. die osteoklastische Tätigkeit endgültig eingestellt wird.
Das Knochenmark verhält sich in der bestrahlten Region wieder unterschiedlich: Die Markräume der Metaphyse verändern sich allmählich aplastisch-gallertig und lassen deutliche Ansätze einer

Fibrosierung erkennen, während die Schädigung in den bestrahlten Diaphysenanteilen sich auf eine Fettvermehrung beschränkt. Im Epiphysenmark besteht etwa die gleiche Verminderung hämopoetischer Zellen wie in der 1. Woche p.irr., so daß das Syncytium der Retikulumzellen hier deutlich hervortritt.

6 und 9 Wochen p.irr. wird im Knorpel ein Höhepunkt der Regeneratbildung beobachtet. Die Regenerate nehmen in mehreren Einheiten häufig große Teile der Knorpelplatte ein und enthalten kleine, geordnete Zellsäulen. Vom Rand der Knorpelfuge einsprossende Gefäßkapillaren können durch Abräumung des devitalisierten Knorpels dem Regenerat Anschluß an die freie Markhöhle verschaffen; ohne daß ein Beitrag zum Längenwachstum stattfindet, kommt dann in umschriebenen Bereichen durch Produktion sekundärer Spongiosa auch eine endochondrale Ossifikation in kleinem Maßstab wieder in Gang. Die Tibia ist an diesen Vorgängen wesentlich stärker beteiligt als der Femur.

Im Knochenmark führen die degenerativen Veränderungen praktisch zur Aplasie. Sie erstreckt sich im Femur bis an die Grenze des Bestrahlungsfeldes in der Diaphyse, in der Tibia jedoch meist nur wenig über die Metaphyse hinaus, obwohl die Strahlenfelder hier ähnlich liegen. Eine unterschiedlich ausgeprägte Fibrose in der Metaphyse ist die Regel. Grobe kollagene Faserbündel strahlen von den Trabekeln und der Compacta aus, umspinnen die Knochenbälkchen in dichten Zügen oder bilden Brücken zwischen benachbarten Trabekeln. Durch basophile Kalk- oder Knochenauflagerungen an alle knöchernen Oberflächen und durch spritzerartige Verkalkungsherde in den fibrotischen Markräumen entsteht vor allem in der knorpelseitigen Hälfte der Metaphyse ein eigenartig bizarres Bild mit starker Sklerosierung. In der distalen Metaphyse läuft die umfangreiche Neubildung von atypischem Knochengewebe in besser differenzierten Formen ab. Die Fibrose spielt hier als Grundlage der Knochenbildung meist eine geringere Rolle; unter Umständen kann auch die überschießende Produktion einer Art Grundsubstanz beobachtet werden, die der Verkalkung weit vorauseilt. Insgesamt ist in der Metaphyse somit die reguläre Knochenapposition durch ein ganzes Spektrum unreifer osteogener Prozesse ersetzt, das von dystrophischer Verkalkung bis zur Bildung eines Geflechtknochens von annähernd normaler Struktur reicht.

Neben den vielfältigen produktiven Prozessen finden sich auch Zeichen von Knochenabbau. Vorwiegend im Femur entstehen durch langsame Klastentätigkeit in der subchondralen Zone größere Resorptionshöhlen, die allerdings nie zur völligen Separation von Knorpel und Spongiosa führen (Abb. 4). In der Tibiametaphyse tritt eine Osteolyse größeren Umfangs im Rahmen von partiellen Erholungsvorgängen auf. Etwa von der 6. Woche an schiebt sich hier regelmäßig entlang der medialen Compacta vom wenig geschädigten Mark der Diaphyse aus eine Markzunge nach oben bis zur Epiphysenfuge. In ihrem Einzugsgebiet wird die sklerotische Spongiosa weitgehend resorbiert, die stehenbleibenden Reste aber umgehend durch Apposition von regulärem Knochen zu großen, locker stehenden Trabekeln rekonstruiert (Abb. 14). Die eingemauerten Reste bleiben dabei durch ihren vermehrten Gehalt an basophilen Strukturen, wie verbreiterte Kittlinien und atypische Auflagerungen dauernd kenntlich (Abb. 15). Diese echte Reparation breitet sich bereits von der 6. zur 9. Woche deutlich aus. Die oben beschriebenen Knorpelregenerate lassen im allgemeinen eine enge Beziehung zur Ausdehnung der Knochenmarksregeneration erkennen. Ein Abbruch in der bisherigen Entwicklung stellt sich in den Epiphysen dar. 6 Wochen p.irr. kommt es unvermittelt zum völligen Markuntergang einschließlich der Retikulumzellen. Eine mäßige peritrabekuläre Fibrose, zunächst noch ohne atypische Knochenbildung, bildet sich aus.
Erstmals in diesem Stadium der Strahlenschädigung wird beobachtet, daß die periostale Resorptionszone der Metaphyse sich in eine Anbauzone mit Osteoblastensaum umwandelt. Sowohl in der Tibia wie im Femur kommt am Schaft der Metaphyse über weite Strecken eine ektopische periostale Knochenapposition in Gang, die von der 6. bis etwa zur 19. Woche p.irr. anhält. Der aufgelagerte Knochen ist von regulärem Bau und enthält meist auch mit Endothel ausgekleidete Gefäßkanälchen, während die Kanälchen der benachbarten alten Compactaanteile durchwegs azellulär sind.

12 bis 22 Wochen p.irr. Die weitere Entwicklung in der bestrahlten Metaphyse unterliegt großen individuellen Schwankungen, ist aber wie bereits früher in Tibia und Femur wieder durch gewisse grundsätzliche Unterschiede gekennzeichnet. In der Tibia dehnt sich die Markerholung mit gleichzeitigem Spongiosaumbau weiter

aus. Daneben bleiben aber noch umfangreiche fibrotische und sklerotische Herde bestehen, in denen die atypische Knochenbildung fortgesetzt wird. Dabei zeichnet sich in den späteren Intervallen eine deutliche Tendenz ab, das in den Sklerosierungsherden abgelagerte primitive Knochengewebe durch schrittweise Differenzierung allmählich in reiferes Knochengewebe überzuführen. Die zunächst lückenhafte Struktur der atypischen Knochenformen wird allmählich dichter und homogener, gleichzeitig schwächt sich die ausgeprägt basophile Farbreaktion ab oder schlägt sogar um in eindeutige Eosinophilie, wie sie für normales Knochengewebe typisch ist. Als Beispiel einer solchen Metaplasierung im weiteren Sinn kann auch die allmähliche Zuschüttung der kleinen fibrotischen Markräume in der proximalen Metaphyse angesehen werden. Sie beginnt etwa in der 6. Woche p.irr. in Form dystrophischer Verkalkungen in den groben kollagenen Faserbündeln und wird solange fortgesetzt, bis ein dichtes knochenähnliches Gewebe in den Spätstadien die alte Compacta und Spongiosa zu einem Knochenkonglomerat verkittet.
Im Femur setzt die partielle Wiederbesiedlung mit Markzellen um viele Wochen später ein als in der Tibia. Das neue Knochenmark ist zunächst meist zellarm, die Regenerationsherde dadurch weniger markant abgesetzt. Charakteristisch bleibt hier auch weiterhin eine von der Markerholung unabhängie Klastentätigkeit, die sich wieder vorwiegend in der subchondralen Zone abspielt, in einem Gebiet also, das in der Tibia besonders stark sklerosiert ist. Im übrigen ist die parallele Entwicklung von Reparation und Sklerosierung für den Femur ebenso bezeichnend wie für die Tibia. Die langsame Ausbreitung der Markerholung führt bis zur 22. Woche p.irr. in beiden Röhrenknochen zu einer weitgehenden Rekonstruktion der Metaphyse. Der Vergleich mit dem durch eine deutliche Altersinvolution geprägten Bild der unbestrahlten Seite zeigt, daß in Einzelfällen praktisch ein Abschluß der Reparation erreicht werden kann.
Die im gleichen Zeitraum an der Epiphysenfuge ablaufenden Veränderungen erscheinen relativ einheitlich. Zunächst (12. Woche p.irr) werden noch einzelne Regenerate mit bevorzugter Lokalisation in der medialen Tibiaepiphysenfuge beobachtet. Sie sind allerdings weniger ausgedehnt, enthalten kaum noch Zellsäulen und haben infolge knöcherner Verbauung den Anschluß an die Markhöhle meist verloren. Späterhin verschwinden auch die letzten Spuren abge-

laufener Regeneratbildung, so daß anzunehmen ist, daß sich die Regenerationsfähigkeit nach einem Höhepunkt in der 6. bis 9. Woche allmählich erschöpft. Unabhängig davon schreitet an der Unterseite der übrigen Knorpelfuge die Knorpelverkalkung offenbar noch über längere Zeit fort. Der hyaline Knorpel wird durch diesen Vorgang allmählich aufgebraucht und wandelt sich bis zur 22. Woche p.irr. mit Ausnahme einzelner azellulärer Inseln in eine solide Platte aus verkalktem Knorpelgewebe um, das zur Metaphyse hin durch eine schmale Knochenleiste abgeschlossen wird. Ein Ersatz des verkalkten Knorpels durch Knochengewebe findet auch in späteren Intervallen (3o bis 4o Wochen p.irr.) nicht statt. Meist kommt es jedoch abschnittsweise zur Resorption der ehemaligen Epiphysenfuge, so daß die Markhöhlen von Metaphyse und Epiphyse darn konfluieren.

Auch die unbestrahlte Knorpelfuge erhält zu dieser Zeit im Zuge ihrer Involution einen definitiven knöchernen Abschluß, unterscheidet sich aber von der bestrahlten Seite durch ihren verbleibenden großen Anteil an hyalinem Knorpel und eine relativ schmale Zone von verkalktem Knorpelgewebe.

In der Epiphyse tritt von der 12. Woche an zum Teil beträchtliche Fibrosierung mit gleichzeitiger Produktion von atypischem Knochengewebe ein. Die Sklerosierung gestaltet sich individuell sehr unterschiedlich und braucht auch keineswegs dem Grad der Veränderung parallel zu gehen, der in der zugehörigen Metaphyse beobachtet wird. Reparationserscheinungen werden zunächst vermißt, da sie von der Erholung des Knochenmarks abhängen, das Epiphysenmark aber offenbar aus eigener Kraft meist nicht mehr regenerieren kann. Die Wiederbesiedlung erfolgt erst nach partieller Resorption der Epiphysenfuge von der Metaphyse aus. Massive Sklerosierungen der Epiphyse können daher noch angetroffen werden, wenn der übrige Knochen längst repariert ist (in einem Fall 66 Wochen p.irr.).

Nachträglich ist zu erwähnen, daß die Veränderungen der Patellae nach Art und zeitlichem Verlauf überraschend genau mit dem Schädigungsbild der Epiphyse übereinstimmen. Dies beruht wahrscheinlich auf der großen Ähnlichkeit hinsichtlich anatomischer Struktur und Wachstumsform: Beide Knochenteile besitzen einen identischen Aufbau mit zentraler Spongiosa und dünner knöcherner Kapsel, sowie

die gleiche Art des Größenwachstums, das jeweils durch Metaplasierung des mit der knöchernen Kapsel verwachsenen Sehnen- und Knorpelgewebes erfolgt. Größere Veränderungen dieser Schichten waren histologisch nicht nachweisbar.

Das periostäre Gewebe im Bestrahlungsfeld ließ meist keine wesentliche Schädigung erkennen. Dies ist vor allem im Hinblick auf die Blutgefäße bemerkenswert.

II. Autoradiographische Untersuchungen über den Einbau von ^{45}Ca.

Der Ca-Einbau als biologisch wichtige und zudem experimentell gut abgrenzbare Teilfunktion des komplexen Mineralstoffwechsels steht im Mittelpunkt unserer Untersuchung. In der Versuchsgruppe A wurden hierfür 3o Tiere in Abständen von 1 bis 22 Wochen p.irr. getötet, einige weitere außerdem zu späteren Versuchspunkten zwischen dem 16. und 19. Monat nach Bestrahlung. Die Tötung erfolgte jeweils 48 Stunden nach der Markierung mit dem Radionuklid. Nach diesem Intervall ist man sicher, daß das inkorporierte ^{45}Ca im Skelett fest fixiert und den schnellen Austauschvorgängen entzogen ist, während andererseits die Resorption von markiertem Knochen noch keine nennenswerte Rolle spielt. Bisherige quantitative Stoffwechseluntersuchungen sind vorwiegend mit diesem Markierungsmodus ausgeführt worden, so daß sich uneingeschränkte Vergleichsmöglichkeiten mit den autoradiographischen Befunden ergeben.

Das normale Verteilungsmuster von ^{45}Ca im Röhrenknochen ist unseres Wissens bisher nur makroautoradiographisch näher untersucht worden (2,2o). Das histoautoradiographische Einbaumuster ist wahrscheinlich mit dem von ^{32}P identisch, wie es Leblond und Mitarbeiter bereits 195o (46) für die Rattentibia beschrieben haben. Dies gilt zumindest für die Nuklidverteilung im Knochengewebe, während die Einlagerung in den Knorpel davon möglicherweise etwas abweicht. Abgesehen davon gewährleistet die Verwendung des weicheren ß-Strahlers ^{45}Ca (Maximalenergie 25o keV) eine wesentlich bessere autoradiographische Auflösung, als sie mit ^{32}P (Maximalenergie 1.7 MeV) erreichbar ist.

A. Das Verteilungsmuster von ^{45}Ca im unbestrahlten Kniegelenk.

Den Ausgangspunkt für die Beurteilung der Strahlenwirkung bildet das autoradiographische Bild des unbestrahlten Kniegelenks, wie es sich bei der 9 Wochen alten Ratte 48 Stunden nach der Inkorporation von ^{45}Ca darstellt. Das Aktivitätsmuster ist dabei in seinen Grundzügen in der proximalen Tibia und im distalen Femur gleich (Abb. 5).
Bereits im Übersichtsbild kann zwischen der Markierung präformierter Knochenteile und den Zonen aktueller Verkalkung deutlich unterschieden werden. So weist bereits vor der Injektion niedergelegtes und zumindest teilmineralisiertes Knochengewebe eine mehr oder weniger lockere diffuse Markierung auf, während sich die Stellen aktueller Knochenneubildung und Knorpelverkalkung infolge ihrer hohen Ca-Einbaurate durch eine intensive Schwärzung auszeichnen. In der Metaphyse finden sich derartige "heiße" Markierungen zunächst über den verkalkenden Knorpelresten der Epiphysenfuge, angeordnet in der Reihe der primären Spongiosa. Sie gehen nach distal unmittelbar über in die massiven Schwärzungen der Knochenapposition im Bereich der endochondralen Ossifikation. Noch weiter distal lösen sich diese Schwärzungsmaxima dann auf in einzelne diskrete Randsäume an den Sekundärtrabekeln als Ausdruck eines umschriebenen Knochenanbaus (Abb. 6).

Ebenfalls sehr intensiv ist der ^{45}Ca-Einbau ferner jeweils an der endostalen Oberfläche des corticalen Knochens, ausgenommen die mediale Compacta der Tibia. Das Markierungsmuster zeigt hier etwa folgenden Ablauf: In Knorpelnähe macht die Verteilung der Schwärzungssäume zunächst deutlich, wie aus den peripher gelegenen Trabekeln der Metaphyse in einem "Schafteinzugsgebiet" ein kompakter Knochen zusammengekittet wird. In der mittleren Metaphyse gehen diese Schwärzungen in die eigentliche endostale Schaftmarkierung über, die in ihrer vielgestaltigen und zum Teil mehrschichtigen Anordnung noch ein buntes Muster bildet, das ebenfalls auf rasche Knochenapposition schließen läßt. Erst in der Diaphyse bildet sich die Markierung allmählich zu einem glatten Einbausaum zurück.
Während die periostale Schaftoberfläche im Bereich der Metaphyse ein ausschließlich der Resorption vorbehaltenes Gebiet dar-

stellt, finden sich in der Diaphyse auch einzelne subperiostal gelegene Anbausäume. Sie besitzen meist nur mäßige Intensität und geringe Ausdehnung, sind anatomisch jedoch offensichtlich konstant. Wie Tomlin e.a. (66) gezeigt haben, dienen sie weniger dem Dickenwachstum der Compacta als den im Zuge des Längenwachstums notwendigen Formänderungen der Diaphyse. Im Inneren des kompakten Knochens sind außerdem vereinzelt erhöhte Aktivitätseinlagerungen um die Gefäßkanälchen herum anzutreffen. Es handelt sich hierbei nicht um den sekundären Umbau Havers'scher Osteone, wie er nur im Skelett höherer Tiere stattfindet und auch autoradiographisch nachgewiesen wurde (1, 3, 49), sondern um eine primäre Knochenbildung. Das Rattenskelett ist relativ einfach strukturiert, besitzt zwar lamellären Knochen, jedoch keine Organisation in Form der Havers'schen Osteone.
Gegenüber den Schwärzungsmustern von Metaphysenspongiosa und Schaft, die funktionell nicht völlig getrennt werden können, bildet das Markierungsmuster der Epiphyse eine selbständige Einheit. Die Knochenbälkchen sind ähnlich wie die Sekundärtrabekel der Metaphyse mit einzelnen Randsäumen besetzt, deren vergleichsweise geringe Intensität allerdings auf einen entsprechend langsameren Knochenanbau schließen läßt. Bemerkenswert ist der schwache, teilweise verwaschene Schwärzungssaum, der an der Oberfläche der knöchernen Epiphysenkapsel verläuft. Er weist auf eine langsame Verkalkung und Verknöcherung des angrenzenden Sehnen-, Binde- und Knorpelgewebes (Gelenkknorpel) hin, ein Metaplasierungsvorgang, der auch der spongiös umgebauten Epiphyse der adulten Ratte noch ein gewisses Größenwachstum ermöglicht (12).
Wie bereits erwähnt, findet sich neben diesen typischen Markierungszonen mit ihrer hohen ^{45}Ca-Konzentration autoradiographisch über allen präformierten Knochenteilen zusätzlich eine lockere diffuse Markierung. Ihre Intensität ist keineswegs einheitlich und richtet sich mit einer Gesetzmäßigkeit nach dem Kalkgehalt des zugrundeliegenden Knochengewebes. Relativ hohe Markierung zeigen junge Knochenstrukturen mit niedriger Kalkdichte, während mit steigendem Alter und damit zunehmendem Mineralisationsgrad die Ca-Affinität deutlich zurückgeht. Aufgrund dieser Beziehung unterliegt auch der diffuse ^{45}Ca-Einbau einer charakteristischen Verteilung.

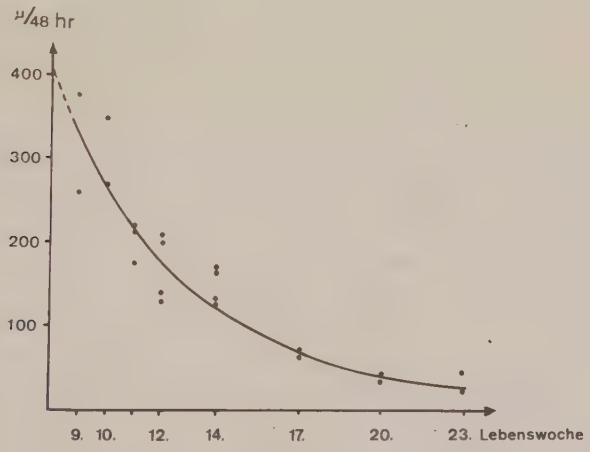
Die höchste Intensität wird in der jungen subchondralen Spongiosa der Metaphyse beobachtet, während mit wachsendem Abstand der Trabekel von der Epiphysenfuge die diffuse Aktivität stetig abnimmt. Ein ähnlicher Gradient wird auch im corticalen Knochen von den knorpelnahen Abschnitten zur Diaphyse hin sichtbar. Zusätzlich überlagert sich hier ein Aktivitätsgefälle vom jungen Knochen der endostalen Anbauzone hin zur periostalen Oberfläche. Den niedrigsten absoluten Wert erreicht die diffuse Markierung daher über der mittleren Diaphyse, die maximal mineralisiertes Knochengewebe mit sehr niedriger Ca-Affinität enthält. Ein gewisses Aktivitätsprofil zeigt ferner die Epiphyse, wo die Markierungsdichte vom Gelenkknorpel nach innen allmählich zunimmt und insbesondere in der der Epiphysenfuge aufgelagerten basalen Knochenplatte stets deutlich erhöht ist.

Das 48-stündige Intervall zwischen Inkorporation und Tötung reicht bereits aus, um einige Verschiebungen im ursprünglichen Aktivitätsmuster herbeizuführen, die durch intervenierendes Knochenwachstum bedingt sind. Dies betrifft weniger die Schwärzungssäume der Knochenapposition, die auch nach dieser Zeit fast überall noch in oberflächlicher Position vorliegen. Sehr deutlich ist der Effekt hingegen an den unmittelbar nach Injektion gebildeten subchondralen heißen Knorpelmarkierungen. Infolge der raschen Knorpelproliferation werden sie im Autoradiogramm bereits in meßbarem Abstand von der histologisch erkennbaren aktuellen Knorpelverkalkungsgrenze angetroffen. In der Tibia macht diese Verlagerung über 48 Stunden ca. 35o bis 4oo µ aus, woraus sich eine tägliche Wachstumsrate der Knorpelfuge von annähernd 2oo µ errechnet (Abb. 7,8).

Altersbedingte Veränderungen im normalen Verteilungsmuster.

Das beschriebene Verteilungsmuster des Ca-Einbaus gilt für die 9 Wochen alte Ratte, erfährt aber mit zunehmendem Alter noch sehr ausgeprägte Veränderungen. Es ist notwendig, sich über diesen physiologischen Ablauf ein genaues Bild zu machen, da er sich auch im bestrahlten Knochen über die Dauer des Experiments dem Schädigungsverlauf überlagert.
Einen bekannten Alterseffekt stellt die Verlangsamung des Längenwachstums dar. Sie führt zu einer allmählichen Verkürzung der 48-Stunden-Verschiebung der markierten Knorpelreste und

kann durch mikrometrische Abstandsbestimmung recht genau erfaßt werden. Die Tibiaepiphyse ist für diese Untersuchung bevorzugt geeignet, weil sie sowohl die größere Wachstumsgeschwindigkeit wie auch die übersichtlichere Wachstumszone besitzt. Wie der Kurvenverlauf in Text-Abb. 1 zeigt, tritt eine rasche Abnahme der Wachstumsrate mit fortschreitendem Alter ein; bis zur 23. Woche werden die Verschiebungswerte schließlich so gering, daß die weitere Bestimmung wegen zunehmender Ungenauigkeit nicht mehr sinnvoll ist. Bei den jungen Tieren fällt die erhebliche Streuung der Werte auf.



Text-Abb. 1. Wachstumsgeschwindigkeit der proximalen unbestrahlen Tibiaepiphysenfuge (in µ/48 Std.).

Ausschlaggebend für die Altersveränderung im autoradiographischen Bild ist der allgemeine Rückgang der Ca-Einlagerung. Er betrifft sämtliche Einbaustätten, führt aber auch zu morphologischen Änderungen im Verteilungsmuster der einzelnen Knochenabschnitte:

In der Epiphyse werden die Anbausäume um die lo. - ll. Lebenswoche (2 Wochen nach Versuchsbeginn) in auffallender Weise reduziert, ohne daß im histologischen Bild eine entsprechende Umstellung aufzufinden ist. Sie bilden sich dann ebenso wie der metaplastische Verkalkungssaum bis zum 4. Monat weitgehend zurück. Gleichzeitig sinkt auch die diffuse Aktivität langsam ab.

In der Metaphyse verläuft die Abnahme des Ca-Einbaus kontinuierlich, abgesehen von einer gewissen Beschleunigung um die 17. bis 2o. Lebenswoche. Bis zu dieser Zeit wird insbesondere der konzentrierte heiße Einbau in der knorpelnahen Spongiosa auf eine schmale subepiphysäre Zone eingeschränkt, während die übrige Spongiosa nur noch locker mit Anbausäumen besetzt ist. Schon vorher erfolgt subchondral häufig eine Trennung der Schwärzungszonen von primärer und sekundärer Spongiosa, so daß die Markierung der Knorpelverkalkung durch eine relativ aktivitätsarme Zone von 11o - 14o µ Breite von der Schwärzung der endochondralen Verknöcherungszone separiert erscheint (Abb. 9). Diese Zweiteilung, die auch an Wachstumsfugen mit geringer Wachstumsgeschwindigkeit, wie z.B. im Caput femoris beobachtet wird, scheint mit der Verlangsamung der endochondralen Knochenbildung zusammenzuhängen. Unter Zugrundelegung einer täglichen Wachstumsrate von rund 3o µ in der 2o. Woche kann eine Distanz von 12o µ dahingehend interpretiert werden, daß ein Knorpelbälkchen erst etwa 4 Tage nach seiner präparatorischen Verkalkung von Knochen umkleidet wird.

Der weitere Rückgang der Anbautätigkeit in der sekundären Spongiosa führt um den 6. Monat dazu, daß die Schwärzungsmaxima sich überwiegend auf eine subchondrale Doppelreihe und die subendostalen Markierungen beschränken; bis zum 7. Monat bleibt von der subchondralen Schwärzung nur die Reihe der Knorpelverkalkung vollständig erhalten. Einige kräftige Säume finden sich dann noch an den großen randständigen Trabekeln, die zu dieser Zeit die Metaphyse aufbauen.

Im subendostalen Einbaugebiet des Schaftes bildet sich das mehrschichtige Schwärzungsmuster bis zum 5. Monat kontinuierlich zu einem glatten Saum zurück. Auch dieser zunächst noch breite und intensive Saum wird schwächer und zieht sich aus der Diaphyse zurück, reicht aber im 7. Monat zumindest auf der lateralen Seite noch deutlich über den Metaphysenausgang hinaus. Im gleichen Maße sinkt auch die diffuse Aktivität der Compacta, behält aber wie früher einen gewissen Gradienten zur Diaphyse.

Auf welchen Endzustand die Entwicklung schließlich hinausläuft, zeigt das Bild einiger Tiere, die zwischen dem 16. und 19. Lebensmonat untersucht wurden. Die Epiphyse bietet hier ein relativ "junges Bild, wie es etwa bei 3 - 5 Monate alten Tieren an-

getroffen wird. Sie enthält also eine Anzahl von Schwärzungssäumen und eine beachtliche diffuse Aktivität, die in der basalen Knochenplatte wieder erhöht ist. Die Knorpelfuge ist knöchern verbaut, so daß die Produktion und Verkalkung einer primären Spongiosa entfallen, doch wird zumindest in der Tibia der weitgehend persistierende hyaline Knorpel am Übergang zur abschließenden Knochenleiste teilweise durch einen kräftigen Verkalkungssaum markiert (Abb. 1o). Diese Knochenleiste sowie die randständigen großen Stütztrabekel, aus denen die Metaphyse aufgebaut ist, sind mit einigen kräftigen Anbausäumen besetzt und weisen eine gleichförmige, relative hohe diffuse Aktivität auf. Der endostale Knochenanbau am Schaft ist praktisch eingestellt. In der diffusen Aktivität bleibt die Compacta wesentlich hinter der Spongiosa zurück; die Konzentration ist nach wie vor in Knorpelnähe noch etwas erhöht und sinkt zu außerordentlich niedrigen Werten in der Diaphyse. Insgesamt kann festgestellt werden, daß sich die drastisch verminderte Gesamteinlagerung anteilmäßig mehr zur diffusen Einbauform verschoben hat.

B. Das autoradiographische Bild der bestrahlten Seite.

Im Anschluß an die einmalige Bestrahlung mit 2ooo R kommt es 1 Woche p.irr. bereits zu einer deutlichen Depression der ^{45}Ca-Aufnahme. Sie manifestiert sich in den verschiedenen Einlagerungsstätten allerdings unterschiedlich. Folgende Veränderungen im Verteilungsmuster lassen sich im einzelnen festlegen (Abb. 11):

Unter der Knorpelfuge heben sich die Schwärzungen des präparatorisch verkalkten Knorpels wie auf der Kontrollseite durch ihre Intensität heraus, unterscheiden sich aber wesentlich durch ihre Form und Lage (Abb. 12). Anstelle der vorwiegend längsorientierten Knorpelbälkchen erscheint jetzt ein markiertes Netzwerk von verkalkter Grundsubstanz, das dem hyalinen Knorpel unmittelbar anliegt. Zum Vergleich sei nochmals die Verschiebung in der unbestrahlten Tibiaepiphysenfuge angeführt, die rund 35o µ in 48 Stunden beträgt.
Ein entscheidender Rückgang im Ca-Einbau wird an der sekundären Spongiosa der Metaphyse beobachtet. Der Aktivitätsgehalt ist lediglich in der knorpelnahen Zone noch annähernd normal, hingegen fällt die Intensität der heißen und diffusen Einlagerungen nach distal zu wesentlich schneller ab als in der Kontrollmetaphyse. An der

Compacta ist der subendostale Einbau zumindest im Bereich der Metaphyse etwas abgeschwächt.
In der Epiphyse kann dagegen als unerwarteter Strahleneffekt häufig sogar eine Steigerung der Knochenapposition beobachtet werden. Sie äußert sich sowohl in einer Verlängerung der einzelnen Saumstrecken entlang den Knochentrabekeln wie auch in einer deutlichen Intensitätssteigerung der Schwärzungssäume im Vergleich zur Kontrollseite. Bemerkenswert ist, daß in den betroffenen Kniegelenken (zwei von insgesamt drei) auch die Patellae völlig gleichsinnig mit einer derartigen Stimulierung des Knochenanbaus reagierten.

2 Wochen p.irr. ist ein weiterer Rückgang im Aktivitätseinbau festzustellen, der sich wie vorher im wesentlichen wieder auf die Spongiosa und Compacta der Metaphyse beschränkt. Die Epiphysen weisen keinen sicheren Unterschied zur Kontrolle mehr auf. An der Epiphysenfuge wird eine entscheidende Umstellung in der Knorpelverkalkung sichtbar.

Knorpelfuge. Die zuvor noch netzförmige Markierung der Knorpelverkalkung ist zu einem Band von fleckförmigen Schwärzungen zusammengeschmolzen, das der sterilisierten Knorpelfuge unmittelbar anliegt. Abgesehen von diesem Verkalkungssaum bietet die Grundsubstanz des hyalinen Knorpels keine Anzeichen einer vermehrten Ca-Fixierung.

Metaphyse. Knochenanbau kommt in der verplumpten Spongiosa nur in den peripheren Teilen (Schafteinzugsgebiet) sowie in der distalen Metaphyse vor, dazwischen liegt eine breite subchondrale Zone frei von Markierungssäumen. Auch die diffuse Aktivität der Spongiosa zeigt sich in diesem Bereich deutlich erniedrigt und erreicht höhere Werte nur noch in einem schmalen Band unmittelbar unter der Epiphysenfuge. In der Tibia bildet sich an der lateralen Compacta und den ihr vorgelagerten Trabekeln nun eine Art Geflechtknochen (Abb. 2,14,15), der trotz seines raschen Wachstums nur eine kräftige diffuse Markierung, dagegen keinen ausgesprochenen Randsaum besitzt. Diese von vornherein flächig-disperse Kalkeinlagerung gibt einen weiteren Hinweis auf die interstitielle Entstehungsweise dieses Knochengewebes.
Am Schaft erscheint die normalerweise sehr intensive subendostale Einlagerung bis in den Bereich der oberen Diaphyse hinein abge-

schwächt. Diese Depression ist vor allem im Metaphysenbereich sehr ausgeprägt, wo das mehrschichtige Einbaumuster der Compacta zu einem einfachen Saum mittlerer Intensität zurückgebildet wird, der im Bereich der fibrösen Knochenbildung auch flächig verwischt sein kann.

3 und 4 Wochen p.irr.. Die Ca-Einlagerung nimmt auch weiterhin in der bestrahlten Region deutlich ab, wobei die Depression nunmehr bis an die Grenzen des Bestrahlungsfeldes fortschreitet (Abb. 16). Die Veränderungen an der Knorpelfuge laufen offenbar auf eine rudimentäre Knorpelverkalkung hinaus, die zu einer langsamen Anhäufung von verkalktem Knorpelgewebe unter der Epiphysenfuge führt. Sowohl in der bestrahlten wie in der unbestrahlten Epiphyse wird die Anbautätigkeit zu dieser Zeit sehr stark eingeschränkt, so daß sich diesbezügliche Seitenunterschiede verwischen. Ein deutlicher Strahleneffekt, der auch über die nächsten Wochen verfolgt werden kann, betrifft hingegen die diffuse Aktivität. Während sie in den Kontrollen vom Gelenkknorpel zur Epiphysenfuge hin ansteigt und vor allem in der Basisplatte deutlich erhöht ist, nimmt sie in der bestrahlten Epiphyse einen einheitlichen, erniedrigten Wert an. Damit bleibt die Aktivitätseinlagerung nun auch in der Epiphyse merklich zurück.
In der Knorpelfuge schließen sich die dem hyalinen Knorpel anliegenden, zuvor noch fleckförmigen Schwärzungen zu einem zusammenhängenden, sehr scharfen Saum von beträchtlicher Intensität zusammen (Abb. 13). Die nähere Untersuchung zeigt, daß er genau an der unregelmäßigen Grenze zwischen dem hyalinen und verkalkten Knorpel verläuft, die im Autoradiogramm wenig hervortritt, sich aber bei der Alcianfärbung um so deutlicher heraushebt. In der Epiphysenfuge treten jetzt außerdem Knorpelregenerate auf, die zum Teil intensiv markierte, also verkalkende Knorpeltrabekel enthalten.
Metaphyse. Die Metaphysenspongiosa besitzt am Ende der 4. Woche meist keine Anbausäume mehr. Reste finden sich eventuell im Schafteinzugsgebiet, wenn die Schädigung etwas geringer ist, oder am Metaphysenausgang. Daneben bestehen wieder flächige Einlagerungen in die sich allmählich ausbreitenden unreifen atypischen Knochenneubildungen, die allerdings keinen wesentlichen Beitrag zur Gesamtaktivität leisten. Sehr gering markiert sind die ausgesprochen primitiven Neubildungen, also die breiten basophilen Randsäume,

die fast alle Trabekel umgeben, und die dystrophischen Verkalkungsherde in den kollagenen Faserbündeln der Markräume. Gegenüber dem vorhergehenden Stadium zeigen die alten Spongiosateile eine weitere Abnahme und damit verbunden eine gewisse Nivellierung der diffusen Aktivität. Die Markierungsdichte wird über knorpelnahen Trabekeln allenfalls noch 2 bis 3 mal höher als über der Diaphysencompacta gefunden.

Schaft. Stärker ausgeprägt als bisher ist auch die Depression der Aktivitätseinlagerung im Schaft, die jetzt bis an die Grenzen des Bestrahlungsfeldes reicht. Sie betrifft zunächst die subendostale Markierung, die praktisch erst am Metaphysenausgang einsetzt und hier aufgrund des fibrösen Knochenanbaus meist flächig verwischt ist, während in den bestrahlten Anteilen der Diaphyse das Muster zu einem glatten Saum zurückgebildet ist. Die Beurteilung der diffusen Aktivität wird dadurch erleichtert, daß die Compacta auch in ihrem knorpelnahen Teil durch die fehlende Resorption stark verbreitert ist. Die diffuse Aktivität besitzt kaum mehr ein Längsprofil und ist in allen Schaftteilen stark herabgesetzt. Erhöhte Einlagerungen kommen jedoch auch im bestrahlten Schaft vor als ringförmige Markierungen um Gefäßkanälchen herum, sowie als flächige Erhöhungen, wenn kleine Hohlräume durch fibrösen Knochen verbaut werden.

6 und 9 Wochen p.irr.. Neu ist das Auftreten von Reparationsvorgängen, die vor allem in der Metaphyse der Tibia das autoradiographische Bild beeinflussen. Es kommt dabei wieder zur Apposition von regulärem Knochengewebe mit den entsprechenden saumförmigen Schwärzungen. Im überwiegenden Teil der Metaphyse gehen allerdings die sklerosierenden Veränderungen weiter und erreichen außerordentlichen Umfang. Die Knorpelregeneratbildung erreicht einen Höhepunkt, der auch autoradiographisch zu hervorstechenden Veränderungen führt. Neu ist ferner das Auftreten subperiostaler Anbausäume an der Compacta der Metaphyse, also in einer sehr ungewöhnlichen Lokalisation. Die Gesamteinlagerung in der bestrahlten Region - immer im Vergleich zur Kontrolle, die eine altersbedingte Regression aufweist - durchläuft möglicherweise ein Minimum zwischen der 4. und 6. Woche p.irr., steigt aber danach nur geringfügig an.

Epiphyse. Erstmals in der 9. Woche kann es in der Epiphyse zu Ver-

änderungen in der Knochenstruktur kommen. Es finden sich kleinere Auflagerungen von fibrösem Knochen mit den entsprechenden flächigen Markierungen.
In der Knorpelfuge wird wie bereits früher die Grenze zwischen hyalinem und verkalktem Knorpel durch einen kräftigen Verkalkungssaum markiert. Die Knorpelregenerate - vorwiegend in der medialen Hälfte der Tibiaepiphysenfuge gelegen - haben sich weiter entwickelt und differenziert; markiert sind jeweils die Knorpeltrabekel im Inneren der Regenerate sowie die Knorpelbrücken zwischen den hypertrophierenden Chondrocyten. In einigen Fällen gelingt der Anschluß des Regenerats an die freie Markhöhle und die Wiederaufnahme endochondraler Knochenbildung in geringem Umfang. Die Verteilung der Schwärzungen zeigt in diesem Fall das autoradiographische Bild einer regulären Wachstums- und Verknöcherungszone in verkleinertem Maßstab.
Die Sklerosierung in der stark verdichteten und zur Diaphyse hin verlängerten Metaphyse wird weitgehend durch atypisches Knochengewebe bestritten. Obwohl diese Knochenproduktion über die ganze Metaphyse verbreitet ist und offenbar gleichmäßig fortschreitet, trägt sie zur Gesamteinlagerung an ^{45}Ca nur wenig bei (Abb. 17). Die atypischen Neubildungen sind praktisch immer in Form von diffusen Schwärzungen markiert, wobei sich die Intensität nur in einigen Fällen bereits aus dem histologischen Erscheinungsbild genauer vorhersagen läßt. In der Regel sind die vorwiegend in der proximalen Metaphyse vorkommenden dystrophischen Verkalkungsherde sehr schwach markiert, während Neubildungen, die mit reichlicher Produktion von Grundsubstanz einhergehen, meist intensive Markierung aufweisen. Dieser Typ findet sich bevorzugt in der distalen Metaphyse und vor allem auch an der Compacta des Metaphysenausganges, von der exophytische Knochenwucherungen dieser Art in den Markraum hineinwachsen können.
In der Tibiametaphyse wird das autoradiographische Bild darüberhinaus von der 6. Woche an zunehmend durch Reparationsvorgänge beeinflußt. Vorwiegend in der medialen Hälfte der Metaphyse, entlang der Compacta, breiten sich umschriebene Knochenmarksregenerate aus, in deren Einzugsgebiet die Spongiosa zunächst rarefiziert und nachfolgend durch Knochenauflagerungen zu großen, regelmäßig strukturierten Trabekeln wieder aufgebaut wird. Es handelt sich dabei um eine Wiederaufnahme der normalen Knochenneubildung, was

autoradiographisch an der Besetzung der neuen Trabekel mit regulären Schwärzungssäumen zu erkennen ist. Eine gewisse Häufung von Anbausäumen wird jeweils in der Randzone des Reparationsgebietes beobachtet, weil der Umbau von hier aus aktiv in die sklerotische Spongiosa hinein fortschreitet; gleichzeitig fällt auf, daß in den angrenzenden sklerotischen Teilen vermehrt atypische Knochenneubildungen auftreten können, die sich durch relativ intensive flächige Markierung auszeichnen. Eine deutliche Ausweitung der Reparation ist in der Tibia bereits bis zur 9. Woche p.irr. festzustellen. Im Femur beginnen diese Erholungsvorgänge verzögert und sind nicht so scharf abgegrenzt wie in der Tibia; entsprechend ist auch das autoradiographische Bild verwischter.
Wie zu erwarten wird die diffuse Aktivität der Metaphyse durch diese Umstrukturierung beeinflußt. Neugebildete Trabekel besitzen durchwegs höhere diffuse Aktivität, während sie über den alten Teilen weiterhin einheitlich niedrig ausfällt. Die diffuse Markierung präformierter Knochenteile ist häufig von der primären Verkalkung neu entstehender atypischer Knochenformen kaum zu unterscheiden.

Schaft. Einen regelmäßigen Befund bilden von der 6. Woche an in Tibia und Femur mehr oder weniger ausgedehnte, kräftige Anbausäume unter dem Periost der Metaphyse (Abb. 17,18). Diese Lokalisation ist ektopisch, weil hier normalerweise nur Knochenresorption stattfindet. Die Markierungssäume weiten sich im weiteren Verlauf offenbar aus und gehen 9 Wochen p.irr. nicht selten in die periostalen Anbausäume über, die in der oberen Diaphyse physiologischerweise angelegt sind. Wo diese Verbindung nicht hergestellt wird, bleibt die Compacta im Dickenwachstum deutlich zurück, weil von der endostalen Seite praktisch kein Schaftanbau mehr erfolgt. So ist der subendostale Anbau in der Femurdiaphyse bis an die Grenzen des Bestrahlungsfeldes unterdrückt, in der Tibiadiaphyse stark abgeschwächt. Die stärkere Schädigung des Femurs drückt sich auch in einer leichten Depression der normalen periostalen Anbausäume im Bestrahlungsfeld aus, sowie in einer leichten Erniedrigung der diffusen Aktivität über das Bestrahlungsfeld hinaus. Beides wird in der Tibia nicht beobachtet.

12, 16 und 19 Wochen p.irr.. Der Rückstand in der Aktivitätsein-

lagerung zur unbestrahlten Seite verkleinert sich nur langsam und wird mehr durch die altersbedingte Regression der Kontrolle als durch Erholungsvorgänge der bestrahlten Seite bestimmt. Lokale Änderungen im autoradiographischen Bild ergeben sich aus der Weiterführung der Reparation in der Metaphyse, dem allmählichen Sistieren der rudimentären Knorpelverkalkung und des ektopischen periostalen Anbaus, sowie aus dem Auftreten von intensiv markierten Trabekelgruppen am Metaphysenausgang. Im übrigen bestehen wie vorher gewisse Unterschiede im Bild von Tibia und Femur.

Epiphyse. Dem Gerüst der ursprünglichen Epiphysenspongiosa überlagert sich eine Sklerosierung, die individuell in außerordentlich großen Bereichen schwankt. Der Anbau von atypischem Knochengewebe kann unter Umständen sogar so lebhaft sein, daß die bestrahlte Seite mehr intensive Schwärzungen aufweist als die zu dieser Zeit wenig aktive Kontrolle. Dagegen bleibt die diffuse Aktivität der alten Spongiosateile stets unter dem Kontrollwert.

Knorpelfuge. Der Schwärzungssaum an der Grenze des hyalinen Knorpels ist zunächst noch deutlich nachweisbar, bildet sich aber bis zur 19. Woche im allgemeinen bis auf kurze Saumstecken mäßiger Intensität zurück. Bis zu diesem Zeitpunkt ist die Verkalkungsgrenze bereits so weit in den hyalinen Knorpel vorgerückt, daß die verkalkte Knorpelplatte den überwiegenden Teil der Epiphysenfuge einnimmt. Anderweitige Markierungen entfallen, da nach der 16. Woche die Knorpelregenerate endgültig verschwinden.

Metaphyse. Kennzeichnend für die Metaphyse bleibt das Nebeneinander von umgebauten und fibrosklerotischen Arealen mit den entsprechenden saumförmigen bzw. flächigen Markierungen (Abb. 19). Eine gewisse Konzentrierung von Knochenelementen mit erhöhter Markierung findet sich wieder auf beiden Seiten der Reparationsgrenze, während bereits umgebaute Spongiosateile nur spärlich mit Säumen besetzt sind. Die Aktivitätseinlagerung bleibt dadurch auch bei der Ausweitung der Reparation etwa gleich und dürfte, wenn man nur die erhöhten Markierungen betrachtet, 5 - 10 % der Kontrolle nicht überschreiten. In den Sklerosierungsherden heben sich wie bereits beschrieben einzelne intensivere Markierungen von der diffusen Aktivität der übrigen Spongiosa ab; das autoradiographische Bild erscheint dadurch relativ monoton, besonders im Vergleich zum histologischen Präparat, in dem die unterschiedlich reifen Knochenformen in ihrer Zusammensetzung ein buntes Konglomerat ergeben.

Daneben tritt in Tibia und Femur am Metaphysenausgang oder noch weiter distal im Bereich der oberen Diaphyse häufig eine auffallende, hoch markierte Trabekelgruppe hervor, die im Gegensatz zu den meisten atypischen Neubildungen auch ohne Anlehnung an alten Knochen entstehen kann. Sie steht offenbar in Zusammenhang mit der bereits erwähnten Bereitschaft zur Bildung schnell wachsender Knochenformen in diesem Gebiet. Die Trabekel sind intensiv diffus markiert, mit unregelmäßigen heißen Randzonen an den noch wachsenden Teilen. Die Produktion einer osteoidähnlichen Matrix kann der Markierung - also der Verkalkung - weit vorauseilen. Die Ca-Einbaurate und damit die Wachstumsgeschwindigkeit kommen an die von normalem Knochengewebe heran.
Diese Trennung in Reparationsgebiete einerseits und sklerosierte Teile andererseits ist im Femur weniger markant als in der Tibia, wenn auch die Reparation bis zur 19. Woche insgesamt etwa den gleichen Raum einnimmt. Soweit Anbausäume vorkommen, sind sie eher flächig verbreitert und verwischt, und auch histologisch erscheint der zugrunde liegende Knochenanbau nicht immer völlig regulär.

Schaft. Der autoradiographische Befund am Schaft ist zunächst der gleiche wie in der 9. Woche p.irr.. In der 16. bis 19. Woche werden die ektopischen Anbausäume unter dem Periost der Metaphysencompacta allmählich zurückgebildet, während die physiologischen periostalen Anbaugebiete der Diaphyse, die auch in der Kontrolle vorkommen, noch erhalten bleiben. Soweit vergleichbar, sind diese normalen Anbausäume in ihrer Ausdehnung nicht eingeschränkt und ziehen ohne Intensitätsschwankung über die Grenze des Bestrahlungsfeldes hinweg. Die in der 6. und 9. Woche beobachtete leichte Depression ist demnach vielleicht nur ein vorübergehender Effekt.

Subendostaler Anbau fehlt in der Diaphyse des Femur so gut wie ganz; in der Tibia fällt auf, daß er auch bei offenkundig voller Restitution von Knochenmark und Endost häufig nicht mehr in Gang kommt, möglicherweise weil infolge des lange bestehenden Wachstumsstops die morphogenetische Notwendigkeit zu Formänderungen im Bereich der Metadiaphyse entfällt.
Die diffuse Aktivität der Compacta ist auch weiterhin sehr niedrig, mit leichten lokalen Schwankungen, doch ohne ein einigermaßen stetiges Gefälle von proximal nach distal. Im Femur reicht die Depression nicht selten über die Bestrahlungsgrenze hinaus in unbestrahlte Schaftteile.

22 Wochen p.irr.. Durch die rasch fortschreitende Reparation wird das autoradiographische Bild der Metaphyse dem Bild der stark gealterten Kontrolle schon sehr ähnlich. Der noch beachtliche Rückstand in der Aktivitätseinlagerung ist nun im wesentlichen durch das Fehlen von Knorpelverkalkung und subendostalem Einbau bedingt. Die Epiphyse erscheint wieder als Gerüst alter Spongiosa, dem sich meist ausgedehnte Sklerosierung überlagert mit den entsprechenden flächigen, seltener saumförmigen Markierungen. Sie kann jetzt auch partiell umgebaut sein, wenn nämlich nach Perforation der Epiphysenfuge gesundes Knochenmark von der Metaphyse aus eindringt und die Reparation ermöglicht. Diese Bezirke entsprechen dann in ihrer Aktivitätsverteilung der unbestrahlten Seite.
In der Knorpelfuge ist der hyaline Knorpel durch die Verkalkung stark verschmälert oder bis auf einzelne Inseln überhaupt aufgebraucht. Schwache Verkalkungssäume werden in seltenen Fällen noch beobachtet.
Die überwiegenden Teile der Metaphyse werden ähnlich wie in der Kontrolle von spärlichen großen Trabekeln aufgebaut, die gleichmäßig mit relativ kräftigen Anbausäumen besetzt sind. In den noch bestehenden Sklerosierungsbezirken finden sich wieder flächig erhöhte Markierungen bei sonst sehr niedriger diffuser Aktivität.
Der Schaftanbau zeigt das gleiche Bild wie in der 19. Woche. Eine Depression der diffusen Aktivität über das Bestrahlungsfeld hinaus kann beim Femur mit Vorsicht angenommen werden.

16. - 19. Monat p.irr.. Die weitere Entwicklung läuft auf die schrittweise Beseitigung der noch bestehenden Strahlenschäden hinaus, wenn dieses Ziel auch offenbar nicht völlig erreicht wird und gewisse Residuen zeitlebens bestehen bleiben. Bei den Tieren, die an einem nachgeholten Versuchspunkt zwischen 16 und 19 Monaten p.irr. untersucht wurden, beschränken sich diese Seitenunterschiede im wesentlichen auf die Epiphyse und Knorpelfuge.
Das Bild der Epiphyse reicht in diesem Stadium von weitgehender Reparation bis zu enormer Sklerosierung, wobei vorwiegend die Femurepiphyse eine Tendenz zur Erholung zeigt. Die Verteilung wird in den reparierten Bezirken der Kontrolle ähnlich, wenn auch nicht wieder so regelmäßig. In den sklerotischen Teilen weisen flächige Erhöhungen auf noch aktive atypische Knochenbildung hin. Interessant ist das Verhalten von großen, marmorartig sklerosierten Gebieten in der Tibiaepiphyse, die trotz völliger Devitalisierung,

wie sie durch die leeren Osteocytenhöhlen und das Fehlen von Gefäßen angezeigt wird, immer noch eine gewisse diffuse Aktivität besitzen.
Die Knorpelverkalkung wird völlig eingestellt, obwohl noch kleine Reste von hyalinem Knorpel vorhanden sind. Die Epiphysenfuge besteht im wesentlichen aus verkalktem Knorpel, der zur Metaphyse hin durch eine dünne Knochenleiste abgeschlossen wird. Die Metaphysenspongiosa entspricht in ihrer Aktivitätsverteilung der unbestrahlten Seite, auch wenn sie histologisch noch gewisse Strahlenfolgen erkennen läßt. Die Trabekel sind meist stärker rarefiziert und weniger regelmäßig aufgebaut als auf der gesunden Seite, jedoch wie dort gleichmäßig mit kräftigen Säumen besetzt und von relativ hoher diffuser Aktivität. Sie heben sich damit deutlich gegen die sehr niedrig markierte Metaphysencompacta ab. Schaftanbau kommt nicht mehr vor. Die diffuse Aktivität der Compacta ist von lokalen Schwankungen abgesehen einheitlich und stets niedriger als auf der unbestrahlten Seite. Eine Depression über das Bestrahlungsfeld hinaus scheint nicht mehr zu bestehen.

Bemerkenswert als Strahlenspätfolge ist die großen Zahl von Knochentumoren, die in diesem Versuchsstadium zur Beobachtung gelangte. Acht von 12 Tieren, die 15 Monate nach Bestrahlung noch überlebten, entwickelten in der bestrahlten Region schnell wachsende Neoplasmen, die röntgenologisch kalkdichte Einschlüsse erkennen ließen. In den mikroskopisch untersuchten Fällen handelte es sich um osteoblastische spindelzellige Sarkome mit herdförmiger, teils auch ausgedehnter Neubildung von kleinen Knochenbälkchen. Autoradiographisch stellt sich die Markierung dieser Trabekel unterschiedlich dar; da das zugrundeliegende Knochengewebe relativ reif erscheint, kann anhand der Markierungsintensität eine Unterscheidung zwischen alten und jüngeren bzw. noch wachsenden Knochenherden getroffen werden.

III. Autoradiographische Untersuchungen über die Retention von inkorporiertem ^{45}Ca.

Die Tiere der Gruppe B wurden praktisch simultan mit der Bestrahlung markiert und danach in Abständen von 1 bis 9 Wochen getötet. Mit dieser Versuchsanordnung wird der Frage nachgegangen, welchen physiologischen Veränderungen das Verteilungsmuster von ^{45}Ca in längeren Zeitabständen nach der Markierung unterliegt und wie dieser normale Ablauf durch die Bestrahlung beeinflußt wird. Die Veränderungen des Verteilungsmusters spiegeln dabei letztlich alle Wachstums- und Umbauvorgänge wider, die im unbestrahlten und bestrahlten Knochen nach der primären Fixierung des Nuklids stattfinden.

A. Knochenwachstum und Retentionsmuster im unbestrahlten Kniegelenk

Über den normalen Ablauf sind wir durch makroautoradiographische Untersuchungen von Comar e.a. (2o) am Schweinefemur, sowie vor allem durch histoautoradiographische Untersuchungen von Leblond e.a. (46) an der Rattentibia in den Grundzügen unterrichtet. Obwohl in der klassisch gewordenen Arbeit von Leblond die Retention einer ^{32}P-Dosis nur über die Dauer einer Woche verfolgt wird, sind die wesentlichen Erkenntnisse über Wachstum und Formänderung im Bereich der Metaphyse aus der Verlagerung und schrittweisen Eliminierung der Markierungen darin bereits abgeleitet worden. Unsere eigenen Beobachtungen, soweit sie den unbestrahlten Knochen betreffen, können diese Ergebnisse nur bestätigen. Sie erstrecken sich allerdings über ein längeres Zeitintervall, beschreiben erstmals auch die in der Epiphyse ablaufenden Veränderungen und gehen auf das Verhalten der diffus markierten Knochenteile ein.
Die richtige Beurteilung der eigenen Befunde wird wesentlich erleichtert, wenn man sich von vornherein über die grundsätzlichen Mechanismen im klaren ist, die am Verteilungsmuster angreifen. Dies gilt vor allem für die beobachtete Verschiebung der Markierungen, die ausschließlich durch die Gestaltsänderungen des Knochens vorgetäuscht wird. In Wirklichkeit bewahren die markierten Elemente stets ihre ursprüngliche Lage im Knochen, unterliegen aber im Laufe der Zeit den folgenden Einwirkungen:

1. Einer relativen Verlagerung von der Epiphysenfuge nach distal, hervorgerufen durch das Längenwachstum

2. einer Verlagerung ins Knocheninnere durch nachträgliche Knochenapposition
3. einer fortschreitenden Eliminierung durch Resorption markierter Strukturen
4. langfristigen Austauschvorgängen (Rücktausch von ^{45}Ca ins Serum), wodurch die Intensität der Markierungen über die Versuchsdauer allerdings noch nicht wesentlich beeinträchtigt wird.

Eigene Befunde.

Die Markierungsmuster von Epiphyse und Metadiaphyse bilden hinsichtlich des Knochenumbaus jeweils eine funktionelle Einheit und werden daher zweckmäßigerweise in ihrer Entwicklung gesondert betrachtet.

Metadiaphyse. 1 Woche p.inj. liegt die proximale Front der endochondralen Markierungen in der unbestrahlten Metaphyse nicht mehr subchondral, sondern rund 1.5 mm unter der Epiphysenfuge und damit weit außerhalb der Zone der endochondralen Verknöcherung. Die Knorpelmarkierungen sind zentral in sekundäre Trabekel eingebaut; distal davon finden sich die ehemaligen Knochenappositionssäume ebenfalls bereits weit ins Innere der Trabekel verlagert. Knorpel- und Knochenmarkierungen lassen sich in gleicher Höhe auch im Schaft nachweisen, der hier noch weitgehend aus Trabekeln aufgebaut ist. Ihre Identifizierung ergibt sich ohne weiteres aus der Beziehung zu den gefärbten Knorpelresten und Kittlinien der eingemauerten Trabekel.In der Compacta setzen sich die Markierungen nach unten fort in die Schwärzungen des endostalen Kittknochens und des gleichfalls eingewanderten endostalen Schwärzungssaums. Das gesamte subepiphysäre Markierungsmuster scheint somit aus der subchondralen Lage nach distal und aus der ursprünglich oberflächlichen Position ins Knocheninnere verlagert. Resorptionslücken zeigt vorerst nur die Spongiosa im zentralen Teil der Markhöhle.
2, 3 und 4 Wochen p.inj. durchwandern die endochondralen Markierung allmählich die Metaphyse (Abb. 2o, 21), bis 4 Wochen p.inj. die Knorpelmarkierungen etwa in Höhe des Metaphysenausgangs angelangt sind. Die Spongiosa unterliegt dabei allerdings einer fortlaufenden Rarefizierung, so daß vor allem im zentralen Teil der Markhöhle nur vereinzelt markierte Knochenbälkchen persistieren.

In Schaftnähe gelegene Trabekel bleiben dagegen in größerer Zahl erhalten und münden zum Teil in die trichterförmig zusammenstrebende Compacta ein. Entsprechend sind 6 und 9 Wochen p.inj. endochondrale Markierungsreste nur noch in den Schaftteilen anzutreffen und liegen nunmehr ganz im Bereich der Diaphyse.

Die Verschiebung markierter Knochenelemente von der Epiphysenfuge nach distal ist, wie bereits festgestellt, nur eine scheinbare Bewegung. In Wirklichkeit bleiben die markierten Elemente an Ort und Stelle liegen, während Epiphysenfuge und Epiphyse in Richtung auf das Knochenende weiterwachsen. Die ehemalige Metaphyse wandelt sich dabei gleichzeitig sukzessiv in ein neues Teilstück der Diaphyse um. Dieser Umbau erfordert vor allem eine beträchtliche Verlagerung des Schaftknochens nach innen zur Reduzierung des Schaftkalibers, also eine transversale Wachstumsbewegung, die von der Compacta durch das Wechselspiel der endostalen Knochenapposition bei gleichzeitiger subperiostaler Resorption vollzogen wird. Im Wege stehende markierte Knochenbälkchen werden in den Schaft mit eingemauert und sind 2, 3 und 3 Wochen p.inj. immer wieder in verschiedenen Phasen des Einbaus zu beobachten (Abb. 22). Die übrige Spongiosa wird resorbiert, so daß schließlich eine freie Markhöhle entsteht.

Genaueren Aufschluß über diese Wachstumsbewegung der Compacta und ihren zeitlichen Ablauf gibt das Verhalten der endostalen Schaftmarkierung. 1 Woche p.inj. findet sich infolge nachträglicher Knochenapposition der Markierungssaum an allen Schaftteilen bereits deutlich ins Knocheninnere verlagert. Der weitere Verlauf wird vom Umfang der endgültigen Formänderungen bestimmt. In der weit ausladenden lateralen Compacta der Tibiametaphyse, die um mehrere Millimeter nach innen verlegt werden muß, durchsetzt die endostale Markierung bis zur 2. Woche p.inj. mit ihrem proximalen Anteil bereits die ganze Compactadicke und tritt an der Knochenoberfläche aus. Diese Schnittstelle wandert als Folge der raschen periostalen Resorption in den folgenden Wochen zunehmend nach distal und entfernt sich damit auch von den im Schaft noch enthaltenen endochondralen Markierungen (Abb. 2o, 21). Die umfangreiche Gestaltsänderung führt schließlich zwischen der 4. und 6. Woche auch noch zur Eliminierung der endochondralen Markierungsreste, so daß bis zur 9. Woche p.inj. ein großer Schaft-

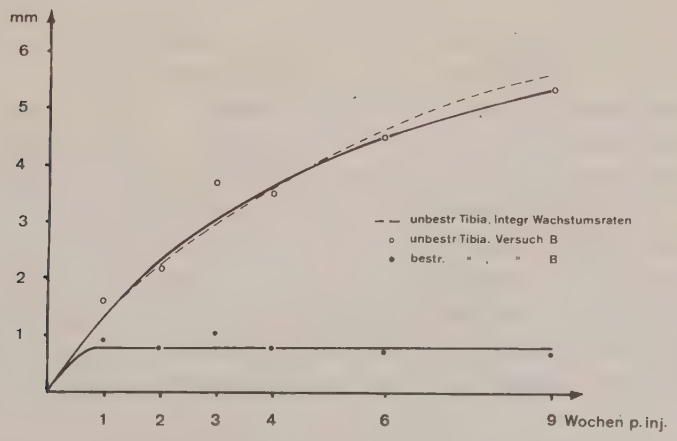
abschnitt rein endostalen Ursprungs entsteht.
Die mediale Compacta der Tibiametaphyse verläuft praktisch gestreckt als fast geradlinige Verlängerung der Diaphysencompacta, so daß sich größere Formänderungen erübrigen. In diesem Schaftabschnitt kann unter Umständen auch in späten Intervallen die gesamte Abfolge des Markierungsmusters von den Knorpelmarkierungen bis zu dem hier relativ schwachen endostalen Saum dargestellt werden.
Eine Mittelstellung nimmt die Metaphyse des Femur ein, die sich symmetrisch und wegen des relativ dicken Diaphysenkalibers nur mäßig verjüngt. Der endostale Saum wandert bis zur 1. Woche p.inj. tief in die Compacta ein und erreicht bis zur 2. Woche in geringem Abstand von den endochondralen Resten die periostale Oberfläche. Diese Lagebeziehung bleibt auch in den folgenden Wochen erhalten, so daß die äußere Formänderung bis zum Ende der 2. Woche als weitgehend abgeschlossen betrachtet werden darf. Auf der endostalen Seite wird die Knochenauflagerung offenbar noch längere Zeit fortgesetzt. Markierte endochondrale Reste bleiben im Schaft bis zur 9. Woche p.inj. nachweisbar.

Quantitative Bestimmung des Längenwachstums. Die scheinbare Verschiebung der markierten Knorpelreste verdient eine nähere Betrachtung, weil sie wieder zur Bestimmung des von der Epiphysenfuge geleisteten Längenwachstums herangezogen werden soll. Wie erwähnt, finden sich markierte Knorpelreste 1 Woche nach Injektion noch in großer Zahl. Sie sind in einigem Abstand von der Epiphysenfuge in einer Front angeordnet, die den geschwungenen Verlauf der Knorpelfuge bis in die Compacta hinein nachzeichnet. Diese Formierung bleibt auch in den nächsten Wochen erhalten, wenn die Knorpelmarkierungen mit wachsender Entfernung von der Epiphysenfuge zunehmend rarefiziert werden. 4 Wochen p.inj. finden sich noch vereinzelte Reste in der distalen Metaphysenspongiosa, von da an können sie nur noch in der Compacta der Diaphyse (mit Ausnahme des lateralen Tibiaschaftes) bis zur 9. Woche nach Injektion verfolgt werden.
Trotz weitgehend äquidistanter Lagerung der Knorpelreste zeigt die genaue Abstandsmessung eine gewisse Streuung der Verschiebungswerte auch innerhalb eines Schnittes, ohne systematische regionale Verteilung. Die Ursache hierfür liegt nicht in selbständigen Wachstumsbewegungen einzelner Trabekel, sondern in der starken Faltung

der Epiphysenfuge sowohl in der Sagittal- wie Frontalebene. Wenn die Wachstumsrichtung nicht genau in die Schnittebene fällt, können zu kleine oder zu große Verschiebungswerte abgelesen werden, was nur durch möglichst dichte Auswertung in verschiedenen Schnittebenen ausgeglichen werden kann. In Tab. 1 sind die Durchschnittswerte aufgeführt, wobei auch die Schnittstauchung mit einem als konstant ermittelten Korrekturfaktor von 1.2 bereits berücksichtig ist. Die Werte der bestrahlten und unbestrahlten Tibiaepiphysenfuge sind außerdem in Kurvenform in Text-Abb. 2 eingezeichnet, zusammen mit der auf planimetrischem Wege integrierten Kurve der Text-Abb.1 (S. 19). Wir gehen dabei von dem Gedanken aus, daß die 48 Stunden-Wachstumsraten praktisch die erste Ableitung der Funktion des Längenzuwachses darstellen.

Wochen p.inj.	1	2	3	4	6	9
unbestr. Tibia	1600 u	2160	3700	3550	4500	5350
bestr. Tibia	900	790	980	760	700	680
unbestr. Femur	1400	2020	3200	3300	4000	4800
bestr. Femur	800	700	900	770	760	700

Tab. 1. Längenwachstum (in µ) der unbestrahlten und bestrahlten Epiphysenfugen des Kniegelenks.



Text-Abb. 2. Längenwachstum der proximalen Tibiaepiphysenfuge nach Bestrahlung in der 8. Lebenswoche mit 2000 R.

Epiphyse. Im Vergleich zur Metaphyse erscheint das Markierungsmuster der Epiphyse auffallend langlebig. Im Laufe der Zeit wandern die Schwärzungssäume nur langsam in die knöcherne Kapsel und die Spongiosa ein und sind daher auch 6 Wochen p.inj. noch fast lückenlos erhalten, wenn anderweitige heiße Markierungen nur noch in der Diaphyse angetroffen werden. Genaueres über die Wachstumsvorgänge läßt sich auch hier an der Verlagerung der Markierungszonen ablesen. Das globale Größenwachstum der Epiphyse ergibt sich aus dem Verhalten des metaplastischen Verkalkungssaums, der von außen scheinbar in die knöcherne Kapsel einwandert und innerhalb von 6 Wochen rund 5o µ zurücklegt. In Anbetracht dieser minimalen Größenzunahme kann die Knochenapposition der Spongiosa nicht eine kontinuierliche Zunahme der Trabekelmasse bedeuten, sondern muß als Ausdruck eines permanenten, auf Änderung der Spongiosaarchitektur abzielenden Knochenumbaus verstanden werden. Tatsächlich läßt sich am Verhalten einzelner Markierungssäume eindrucksvoll verfolgen, wie der Knochenanbau bestehende Trabekel in der einen Richtung erweitert und zum Teil mit benachbarten Trabekeln vernetzt, während sie dafür an anderer Stelle arrodiert, zerteilt oder ganz aufgelöst werden. Der post injectionem gebildete Knochen, der sich vom alten Knochen gut abgrenzen läßt, stellt dabei einen immer größer werdenden Anteil am Gesamtknochen der Spongiosa.

Um diese Erneuerung der Epiphysenspongiosa quantitativ zu erfassen, wurde folgendes morphometrische Verfahren ausgearbeitet: Möglichst große Areale der Epiphyse wurden mit schwacher Mikroskopvergrößerung photographiert und auf ein Format von 3o x 4o cm nachvergrößert. Unter mikroskopischer Kontrolle des Präparates wurden in diese Bilder die Grenzen zwischen alten und neuen Knochenteilen eingezeichnet, die Trabekel dann ausgeschnitten und nach Auftrennung in die beiden Anteile gewogen (Abb. 23). Aus den erhaltenen Werten läßt sich das Verhältnis Neugebildeter Knochen/Gesamtknochen errechnen. Die Genauigkeit hängt wesentlich davon ab, wie gut zwischen alten und neuen Trabekelteilen unterschieden werden kann. Bei einiger Erfahrung ist die Diskriminierung jedoch auch in den späteren Intervallen nicht allzu schwierig, obwohl dann nicht immer ein heißer Saum die Abgrenzung erlaubt. Anbaugebiete, die beispielsweise erst 3 Wochen p.inj. angelegt werden, zeichnen sich nur noch durch diffuse Erhöhung und meist durch

histologische Kriterien, wie z.B. den Verlauf einer Kittlinie aus. Bei mehrfacher Nachprüfung erwiesen sich die ermittelten Werte jedoch als gut reproduzierbar.

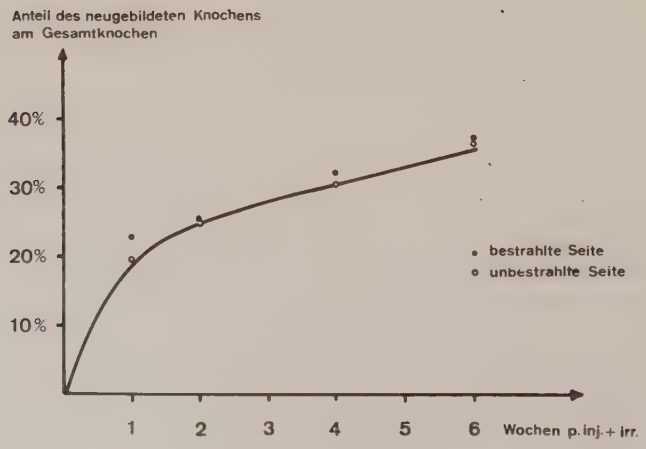
	Wochen p.irr.	Gesamtknochen+ (Flächeneinh.)	neugeb.Knochen+ (Flächeneinh.)	neu/gesamt	Mittelw in %
unbestr. Epiphyse	1	1.571 1.399	0.282 0.286	0.180 0.209	19.4
	2	1.839 1.336	0.451 0.342	0.241 0.252	24.6
	4	1.540 1.364	0.452 0.426	0.300 0.310	30.5
	6	1.999 1.887	0.740 0.670	0.369 0.356	36.2
bestr. Epiphyse	1	2.025 1.642	0.486 0.350	0.237 0.218	22.7
	2	1.648 2.355	0.425 0.57o	0.258 0.252	25.5
	4	1.492 1.475	0.480 0.476	0.323 0.325	32.4
	6	1.634 1.796	0.597 0.655	0.365 0.373	36.9

Tab. 2. Erneuerung der Spongiosa in der unbestrahlten und bestrahlten Femurepiphyse. (+Jeder Zahlenwert aus 2 Bildausschnitten berechnet).

Die ermittelten Werte der Spongiosaerneuerung finden sich in den Tab. 2 und 3, sowie in der Text.-Abb. 3. Die Untersuchung beschränkt sich demnach vorwiegend auf die Femurepiphyse, die wesentlich größer und damit für die Bestimmung besser geeignet ist als die Tibiaepiphyse. Für jeden Versuchspunkt wurden hier 2 Autoradiogramme aus möglichst verschiedenen Ebenen mit jeweils 2 Bildausschnitten (medialer und lateraler Kondylus) ausgewertet. In der Tipiaepiphyse beziehen sich die Werte nur auf den medialen Kondylus, der bereits in einem Ausschnitt voll erfaßt werden kann; hier wurden für jeden Versuchspunkt 3 Autoradiogramme verwertet.

	Wochen p.irr.	Gesamtknochen (Flächeneinh.)	neugeb.Knochen (Flächeneinh.)	neu/gesamt	Mittelwert in %
unbestr.Epiphyse	1	1.743	0.270	0.155	16.8
		1.926	0.328	0.171	
		1.823	0.325	0.178	
	2	1.693	0.366	0.216	
		1.842	0.424	0.230	21.1
		1.922	0.36o	0.187	
bestr.Epiphyse	1	1.638	0.442	0.271	
		1.497	0.357	0.238	24.5
		1.720	0.390	0.226	
	2	1.830	0.355	0.194	
		1.922	0.440	0.229	22.0
		1.742	0.413	0.237	

Tab. 3. Spongiosaerneuerung in der unbestrahlten und bestrahlten Tibiaepiphyse.



Text-Abb. 3. Erneuerung des spongiösen Knochens in der Femurepiphyse nach der 8. Lebenswoche.

Diffus markierte Teile des Knochens. Die heißen Markierungen bilden die Grenze zwischen dem präformierten, d.h. vor der Injektion fertiggestellten und dem seither neugebildeten Knochengewebe. Beide Anteile liegen stets nebeneinander vor, wobei in den früheren Intervallen der alte Knochen überwiegt, in den späteren der neugebildete. Vor allem in der Metaphyse kommt es dabei rasch zu einem Ersatz des alten Knochens.
Die diffuse Markierung zeigt in beiden Anteilen ein charakteristisches Muster. Der alte Knochen scheint im wesentlichen die vom 48-Stunden-Einbau bekannte Verteilung beizubehalten, wobei eine gewisse Abnahme der Intensität am ehesten im hoch markierten Knochen der Metaphysenspongiosa sowie in der knöchernen Basisplatte der Epiphyse eintritt. Dieser fragliche Effekt ist allerdings bereits 1 Woche p.inj. zu beobachten und nimmt im weiteren Verlauf nicht mehr zu. Der alte Schaftknochen läßt auch 6 Wochen p.inj. keinen Unterschied zur ursprünglichen Markierungsdichte erkennen.
Im neuen Knochengewebe setzt die Kalkaufnahme definitionsgemäß erst nach der Injektion von ^{45}Ca ein, so daß die Mineralisierung bereits von Grund auf mit der spezifischen Aktivität des Serums erfolgt. Die Markierungshöhe steht daher in enger Beziehung zum zeitlichen Verlauf der Serumaktivität, für die nach steilem initialem Abfall in den ersten beiden Tagen ein langsames Auslaufen in weiteren exponentiellen Komponenten mit großer Halbwertszeit nachgewiesen wurde (7, 64). In guter Übereinstimmung damit findet sich autoradiographisch über dem neuen Knochen eine äußerst gleichförmig diffuse Markierung, deren Intensität zu den jüngsten Knochenteilen hin nur sehr allmählich abnimmt. Auch über 6 Wochen p.inj. gebildeten Knochenarealen ist sie noch deutlich höher als über den alten Schaftteilen. Zur Beobachtung dieser Verhältnisse eignet sich am besten der Schaft der Femurdiaphyse, da er neben alten Anteilen auch eine umfangreiche Masse von neuem Knochen rein endostalen Ursprungs enthält, die sich bei tangentialer Schnittführung auf eine große Fläche auseinanderziehen läßt.
Insgesamt wird auf diesem Weg eine beträchtliche Aktivitätsmenge in den neuen Knochen eingelagert. Es handelt sich dabei um ^{45}Ca, das durch Resorption markierter Skeletteile mobilisiert wurde und über den Blutkreislauf bei der Verkalkung neuer Mineralisierungszonen wiederverwertet wird. Wie die Autoradiogramme zeigen, ver-

bindet sich mit dieser Umlagerung eine zunehmende Gleichverteilung der Aktivität.

B. Verlauf des Retentionsmusters im bestrahlten Kniegelenk.

Die auffallendsten Unterschiede zur unbestrahlten Seite finden sich im Bereich der Metaphyse. 1 Woche p.irr. beträgt die Verschiebung der Knorpelmarkierungen in der Tibia 900 µ, im Femur 800 µ (Abb. 24) und erreicht damit nur noch etwa die Hälfte des Normalwertes. Während die Knorpelmarkierungen auf der Kontrollseite zu dieser Zeit bereits deutlich rarefiziert sind, bilden sie in der bestrahlten Metaphyse noch eine dichte, fast geschlossene Schwärzungsreihe, die genau parallel zur Epiphysenfuge verläuft. Darüberhinaus ist auch das übrige Muster der endochondralen Markierungen fast vollständig erhalten.
Durch nachträgliche Knochenapposition in der 1. Woche p.irr. sind auch hier die Knorpelmarkierungen in das Zentrum sekundärer Trabekel gerückt. Ebenso finden sich die Markierungssäume der Spongiosa aus ihrer oberflächlichen Position deutlich ins Trabekelinnere verlagert. Der daraus ablesbare Knochenanbau ist in der proximalen Metaphyse am ausgeprägtesten. Histologisch erscheint das aufgelagerte Knochengewebe unauffällig, wie auch die Zone neuer Spongiosa, die sich zwischen Knorpelmarkierungen und Epiphysenfuge geschoben hat, von etwas plumpen, aber sonst normal strukturierten Trabekeln gebildet wird.
2, 3 und 4 Wochen p.irr. werden am Markierungsmuster nur geringfügige weitere Veränderungen beobachtet (Abb. 25, 26). Die Verschiebung der Knorpelmarkierungen erreicht in diesen Intervallen in der Tibia 790, 980 und 760 µ, im Femur 700, 900 und 740 µ. Nach wie vor sind die Knorpelmarkierungen wie auch die übrigen endochondralen Markierungen so gut wie vollständig erhalten. Die weitere Auflagerung von Knochengewebe ist nun vorwiegend auf die distale Metaphyse beschränkt und spielt sich zunächst noch in regulären, dann zunehmend atypischen Formen ab. In der proximalen Metaphyse kommt der Anbau praktisch zum Stillstand. Wie bereits beschrieben, werden hier wieder sämtliche knöchernen Oberflächen mit basophilen Randsäumen belegt, die sich nur noch sehr langsam verbreitern. Für den Gesamteindruck wird nicht die Knochenapposition sondern das Fehlen der Resorption und die fehlende Längsverschiebung ausschlaggebend.

Die Abgrenzung von alten und neuen Trabekelteilen kann anhand der Markierungssäume erfolgen und zeigt, daß 4 Wochen p.irr. in der Metaphysenspongiosa alter und neuer Knochen etwa zu gleichen Teilen vorliegen. Die Kontrollmetaphyse besteht zu dieser Zeit bereits fast ausschliesslich aus neuem Knochengewebe.
6 und 9 Wochen p.irr. beträgt die Verschiebung der Knorpelmarkierungen in der Tibia 7oo bzw. 68o µ, im Femur 76o bzw. 7oo µ. Der Vergleich der Verschiebungswerte von Versuchsbeginn an, wie sie in Tab. 1 aufgeführt sind, zeigt nunmehr deutlich, daß das Längenwachstum nach der 1. Woche p.irr. keine weiteren Fortschritte mehr macht. Der durchschnittliche Wert, der in der graphischen Darstellung der Text-Abb. 2 abzulesen ist, wo auch der Verlauf der Kontrollseite dargestellt ist, beträgt in Tibia und Femur rund 75o µ und entspricht dem endgültigen Längenzuwachs.
6 und 9 Wochen p.irr. werden jedoch deutliche morphologische Veränderungen am Markierungsmuster beobachtet. Im Femur entstehen bis dahin größere Resorptionshöhlen in der subchondralen Zone, die distal bis in die alte Spongiosa hineinreichen und daher deutliche Lücken in den Knorpelmarkierungen verursachen. Die Tibiametaphyse (Abb. 27) zeigt 9 Wochen p.irr. bereits fortgeschrittene Reparationsvorgänge, die ebenfalls das autoradiographische Bild in charakteristischer Weise beeinflussen: Im lateralen sklerotischen Teil verharren die endochondralen Schwärzungen weiterhin unverändert, während sie im umgebauten medialen Teil der Metaphyse bis auf geringe Reste resorbiert und mit neuem Knochen zu plumpen Spongiosabälkchen ergänzt sind (Abb. 28). Diese neuen Trabekel bauen sich aus drei gut unterscheidbaren Anteilen auf: Einem hochmarkierten zentralen Rest, der um die Zeit der Injektion angelegt wurde, anschließenden intensiv basophilen Auflagerungen, deren Entstehungszeit in die 2. bis 3. Woche p.irr. zu verlegen ist, und schließlich aus regulärem Knochengewebe, das den Hauptanteil der neuen Trabekel stellt und vermutlich ab der 5. bis 6. Woche im Zuge der Reparation gebildet wurde.
Nur noch ein Bruchteil der ursprünglich heißen Markierungen ist in der neuen Spongiosa erhalten. Auf diesem Weg dürften auch in der bestrahlten Metaphyse mit der Ausweitung der Reparation die endochondralen Markierungen schließlich eliminiert werden.

Schaft. Wie für die unbestrahlte Seite bereits ausgeführt, hängt die Verlagerung der Schaftmarkierungen bzw. ihre Elimination von den transversal gerichteten Wachstumsbewegungen des Schafts ab. Diese Bewegungen sind besonders im Bereich der Metaphyse sehr ausgeprägt und erfüllen normalerweise die Funktion, die ausladende Metaphyse allmählich auf das schmälere Kaliber der Diaphyse zu reduzieren. Mit der Einstellung des Längenwachstums ist zu erwarten, daß diese Schaftverlegungsvorgänge stark eingeschränkt werden; andernfalls wären erhebliche Deformierungen der Metaphyse zu erwarten, die jedoch praktisch nie beobachtet werden.
Zur Beurteilung der unterschiedlichen Formänderungsvorgänge im bestrahlten und unbestrahlten Knochen müssen als korrespondierende Teile die Knochenabschnitte verglichen werden, die zum Zeitpunkt der Injektion die Metaphyse gebildet haben. Sie finden sich jeweils distal der Knorpelmarkierungen. Ein direkter Seitenvergleich wird dadurch möglich, daß man bestrahltes und unbestrahltes Präparat jeweils mit dem Deckglas aufeinanderlegt - die Spiegelsymmetrie der kontralateralen Röhrenknochen wird dadurch aufgehoben - und unter Deckung der Knorpelmarkierungen im Mikroskop betrachtet. Für die praktische Durchführung hat sich ein selbstgebautet Aufsatz zum Mikroskoptisch bewährt, in dem das untere Präparat fixiert und das obere zur Justierung unabhängig verschoben werden kann.
Der Vergleich zeigt im Femur bis zum Ende der 2. Woche p.irr. keine nennenswerten Seitenunterschiede, sowohl was die Schaftform und Schaftdicke, wie auch was die Lage der Markierungen betrifft. In einigem Abstand distal der intramuralen Knorpelmarkierungen tritt jeweils die endostale Schaftmarkierung an die äußere Knochenoberfläche. Die Untersuchung späterer Stadien zeigt, daß diese Lagebeziehung in allen bestrahlten und unbestrahlten Compactae gleichbleibt. Da sie ein Kriterium für das Ausmaß der periostalen Resorption darstellt, kann daraus abgeleitet werden, daß die äußere Formänderung mit dem Ende der 2. Woche im wesentlichen seitengleich abgeschlossen ist, was auch der rein morphologische Vergleich bestätigt. Mit diesem Übergang zur Diaphysengestalt verbindet sich für die bestrahlte Metaphyse eine leichte endgültige Deformierung. Strukturelle Seitenunterschiede ergeben sich nach der 2. Woche noch insofern, als die bestrahlte Compacta

die nachlassende endostale Anbautätigkeit durch reichliche Einbeziehung schaftnaher Trabekel ausgleicht und dadurch schließlich relativ heterogenes, auch atypisches, Knochengewebe enthält (Abb. 29).
In der Tibia werden größere Seitenunterschiede bis zur 2. Woche p.irr. ebenso wie im Femur vermißt. Erst im weiteren Verlauf wird deutlich, wie die laterale Seite der unbestrahlten Tibia sich zunehmend verschmälert, während die bestrahlte Metaphyse zumindest in Höhe der Knorpelmarkierungen ihre ursprüngliche seitliche Ausladung beibehält und die unbestrahlte Seite daher schließlich weit überragt. Daß auch die laterale Compacta der bestrahlten Tibia nach der 2. Woche noch gewisse Formänderungen durchmacht, erkennt man bei einer Übereinanderprojektion verschiedener Stadien des bestrahlten Knochens. Eine leichte Überbetonung der Schaftkurvatur im Trichterteil der Metaphyse, vor allem aber die zunehmende distale Verlagerung der Austrittstelle des endostalen Saums an der Schaftoberfläche lassen darauf schließen, daß die periostale Resorption hier noch über längere Zeit fortgesetzt wird (Abb. 25 - 27).

Epiphyse. Bei einem ersten Überblick scheint sich das Markierungsmuster der bestrahlten Epiphyse im wesentlichen wie das der unbestrahlten Kontrollseite zu verhalten. Die Schwärzungssäume wandern allmählich ins Innere der Trabekel ein, die damit zunehmend aus neuem Knochen aufgebaut werden, während das Markierungsmuster insgesamt über die Versuchsdauer recht gut erhalten bleibt. Wie für den unbestrahlten Knochen wurde auch hier die Erneuerung der Spongiosa wieder planimetrisch erfaßt; die entsprechenden Werte finden sich in den Tabellen 2 und 3, die Werte der Femurepiphyse außerdem in Text.-Abb. 3 (S. 38). Wie daraus hervorgeht, folgt der Umbau der Spongiosa bis zur 6. Woche p.irr. etwa dem gleichen Verlauf wie auf der unbestrahlten Seite. Ein nennenswerter Seitenunterschied ergibt sich lediglich 1 Woche p.irr., wo die bestrahlte Epiphyse einen deutlichen Vorsprung in der Erneuerung des spongiösen Knochens aufweist. Dies gilt besonders für die Tibiaepiphyse. Bei genauerer mikroskopischer Betrachtung läßt sich dieser Vorsprung einer vorüber-

gehenden Steigerung des Knochenanbaus zuordnen, wie sie aus den analogen Befunden des Einbauversuchs bereits bekannt ist. So fällt auf, daß 1 Woche p.irr. die Markierungssäume in der bestrahlten Epiphyse eine deutlich stärkere Verlagerung ins Trabekelinnere erfahren und eine entsprechend größere Fläche von neugebildetem Knochen demarkieren. Dieser Effekt ist visuell noch eindrucksvoller als es die Zahlenwerte zum Ausdruck bringen, weil gleichzeitig mit der vermehrten Bildung von neuem Knochen an diesem Versuchspunkt eine gewisse Verplumpung der Trabekel durch vermehrt liegenbleibenden alten Knochen beobachtet wurde, die in den Quotienten als Erhöhung des Gesamtknochens eingeht. Im weiteren Verlauf sind strukturelle und autoradiographische Seitendifferenzen dieser Art nicht mehr auffindbar. Der wieder unauffällige Aufbau der Spongiosa und die offensichtlich seitengleich voranschreitende Verschiebung der Markierungssäume lassen darauf schließen, daß weder die Resorptions- noch die Anbauvorgänge bis zur 6. Woche p.irr. wesentlich beeinträchtigt sind.Dieser Eindruck wird durch die entsprechenden Zahlenwerte bestätigt. Das Verhalten der Epiphyse steht in auffallendem Gegensatz zu der frühen und gravierenden Umbaustörung der Metaphysenspongiosa.

Diffus markierte Knochenteile. Bei der Beurteilung des diffus markierten Knochengewebes ist zunächst festzuhalten, daß auf der bestrahlten Seite der alte Knochen nur zu einem geringen Teil resorbiert wird und daher anteilmäßig sehr viel stärker vertreten ist als in der Kontrolle. Seine diffuse Markierung entspricht im wesentlichen wieder dem Einbauschema, ohne nennenswerte Minderung der Intensität bis Versuchsende.

Größere zusammenhängende Gebiete von neuem Knochen entstehen lediglich in der Spongiosazone zwischen Epiphysenfuge und Knorpelmarkierungen, die post injectionem angelegt wird, sowie im endostalen Anbaugebiet des Schafts. Das Gebiet der neuen Spongiosa ist 1 Woche p.irr. abgesteckt und entspricht in der Intensität seiner Markierung durchaus der - bereits weiter auseinandergezogenen - korrespondierenden Zone der Kontrollseite. Das gleiche gilt von dem endostalen Knochen,der noch einige Wochen an der Compacta aufgelagert wird; hier wird allerdings der Eindruck gleichmäßiger Markierung durch die Einmauerung von alten Trabekeln heterogener Aktivität verwischt. Schwierig zu beurteilen sind die atypischen

die nachlassende endostale Anbautätigkeit durch reichliche Einbeziehung schaftnaher Trabekel ausgleicht und dadurch schließlich relativ heterogenes, auch atypisches, Knochengewebe enthält (Abb. 29).
In der Tibia werden größere Seitenunterschiede bis zur 2. Woche p.irr. ebenso wie im Femur vermißt. Erst im weiteren Verlauf wird deutlich, wie die laterale Seite der unbestrahlten Tibia sich zunehmend verschmälert, während die bestrahlte Metaphyse zumindest in Höhe der Knorpelmarkierungen ihre ursprüngliche seitliche Ausladung beibehält und die unbestrahlte Seite daher schließlich weit überragt. Daß auch die laterale Compacta der bestrahlten Tibia nach der 2. Woche noch gewisse Formänderungen durchmacht, erkennt man bei einer Übereinanderprojektion verschiedener Stadien des bestrahlten Knochens. Eine leichte Überbetonung der Schaftkurvatur im Trichterteil der Metaphyse, vor allem aber die zunehmende distale Verlagerung der Austrittstelle des endostalen Saums an der Schaftoberfläche lassen darauf schließen, daß die periostale Resorption hier noch über längere Zeit fortgesetzt wird (Abb. 25 - 27).

Epiphyse. Bei einem ersten Überblick scheint sich das Markierungsmuster der bestrahlten Epiphyse im wesentlichen wie das der unbestrahlten Kontrollseite zu verhalten. Die Schwärzungssäume wandern allmählich ins Innere der Trabekel ein, die damit zunehmend aus neuem Knochen aufgebaut werden, während das Markierungsmuster insgesamt über die Versuchsdauer recht gut erhalten bleibt. Wie für den unbestrahlten Knochen wurde auch hier die Erneuerung der Spongiosa wieder planimetrisch erfaßt; die entsprechenden Werte finden sich in den Tabellen 2 und 3, die Werte der Femurepiphyse außerdem in Text.-Abb. 3 (S. 38). Wie daraus hervorgeht, folgt der Umbau der Spongiosa bis zur 6. Woche p.irr. etwa dem gleichen Verlauf wie auf der unbestrahlten Seite. Ein nennenswerter Seitenunterschied ergibt sich lediglich 1 Woche p.irr., wo die bestrahlte Epiphyse einen deutlichen Vorsprung in der Erneuerung des spongiösen Knochens aufweist. Dies gilt besonders für die Tibiaepiphyse. Bei genauerer mikroskopischer Betrachtung läßt sich dieser Vorsprung einer vorüber-

gehenden Steigerung des Knochenanbaus zuordnen, wie sie aus den analogen Befunden des Einbauversuchs bereits bekannt ist. So fällt auf, daß 1 Woche p.irr. die Markierungssäume in der bestrahlten Epiphyse eine deutlich stärkere Verlagerung ins Trabekelinnere erfahren und eine entsprechend größere Fläche von neugebildetem Knochen demarkieren. Dieser Effekt ist visuell noch eindrucksvoller als es die Zahlenwerte zum Ausdruck bringen, weil gleichzeitig mit der vermehrten Bildung von neuem Knochen an diesem Versuchspunkt eine gewisse Verplumpung der Trabekel durch vermehrt liegenbleibenden alten Knochen beobachtet wurde, die in den Quotienten als Erhöhung des Gesamtknochens eingeht. Im weiteren Verlauf sind strukturelle und autoradiographische Seitendifferenzen dieser Art nicht mehr auffindbar. Der wieder unauffällige Aufbau der Spongiosa und die offensichtlich seitengleich voranschreitende Verschiebung der Markierungssäume lassen darauf schließen, daß weder die Resorptions- noch die Anbauvorgänge bis zur 6. Woche p.irr. wesentlich beeinträchtigt sind.Dieser Eindruck wird durch die entsprechenden Zahlenwerte bestätigt. Das Verhalten der Epiphyse steht in auffallendem Gegensatz zu der frühen und gravierenden Umbaustörung der Metaphysenspongiosa.

Diffus markierte Knochenteile. Bei der Beurteilung des diffus markierten Knochengewebes ist zunächst festzuhalten, daß auf der bestrahlten Seite der alte Knochen nur zu einem geringen Teil resorbiert wird und daher anteilmäßig sehr viel stärker vertreten ist als in der Kontrolle. Seine diffuse Markierung entspricht im wesentlichen wieder dem Einbauschema, ohne nennenswerte Minderung der Intensität bis Versuchsende.

Größere zusammenhängende Gebiete von neuem Knochen entstehen lediglich in der Spongiosazone zwischen Epiphysenfuge und Knorpelmarkierungen, die post injectionem angelegt wird, sowie im endostalen Anbaugebiet des Schafts. Das Gebiet der neuen Spongiosa ist 1 Woche p.irr. abgesteckt und entspricht in der Intensität seiner Markierung durchaus der - bereits weiter auseinandergezogenen - korrespondierenden Zone der Kontrollseite. Das gleiche gilt von dem endostalen Knochen,der noch einige Wochen an der Compacta aufgelagert wird; hier wird allerdings der Eindruck gleichmäßiger Markierung durch die Einmauerung von alten Trabekeln heterogener Aktivität verwischt. Schwierig zu beurteilen sind die atypischen

Neubildungen, die im Laufe der Zeit in der Metaphyse auftreten. Sie werden zunächst meist lückenhaft angelegt und verdichten sich erst allmählich, doch erscheint ihre Markierung im allgemeinen der mutmaßlichen Entstehungszeit adäquat; lediglich die primitiven Neubildungen, die auch im Autoradiogramm durch ihre starke Anfärbung mit Hämalaun gekennzeichnet sind, können auffallend niedrig markiert sein.
Zu den nach der Bestrahlung entstehenden Teilen mit diffuser Markierung gehört auch die verkalkte Knorpelplatte. Bis zur 6. und 9. Woche p.irr. wird sie so breit, daß die diffuse Aktivität bequem untersucht werden kann. Der Befund ist insofern interessant, als die Markierung in ihrer Intensität und Gleichmäßigkeit sich ganz wie bei einem gleichzeitig entstandenen Knochenelement verhält und damit auf eine ähnliche Kalkdichte hinweist. Die Aktivität sinkt also ebenso zu den jüngeren Teilen hin etwas ab und endet am hyalinen Knorpel, der selbst über den Nulleffekt hinaus nicht markiert ist, also sicher kein Calcium speichert.

IV. Orientierende Untersuchungen über die Retention von ^{45}Ca nach Inkorporation in den bereits strahlengeschädigten Knochen.

Die beiden Tiere der Gruppe C wurden 5 Wochen p.irr. markiert und 2 bzw. 4 Wochen später getötet. Das primäre Verteilungsmuster von ^{45}Ca in diesem Stadium der Strahlenschädigung ist aus Versuch A bekannt, so daß die nachträglichen Verlagerungen als solche erkannt und Wachstumsvorgängen zugeordnet werden können. Vor allem die langsame Progression der rudimentären Knorpelverkalkung in der bestrahlten Epiphysenfuge sollte mit dieser Versuchsanordnung direkt sichtbar gemacht werden. Die "Knorpelmarkierung" besteht 5 Wochen p.irr. wie beschrieben in einem Schwärzungssaum am Übergang vom hyalinen zum verkalkten Knorpel, der 2 und 4 Wochen später hinter der histologisch gut erkennbaren Verkalkungsgrenze zurückbleiben müßte, wenn diese tatsächlich in den hyalinen Knorpel hineinwandert.
Die unbestrahlte Seite unterscheidet sich bereits in der primären Einlagerung und nicht nur in den nachfolgenden Wachstumsbewegungen von der bestrahlten Seite so grundlegend, daß sie im allgemeinen für den Seitenvergleich nicht in Frage kommt. Sie soll aber daraufhin untersucht werden, ob sie mit den Ergebnissen von Versuch B übereinstimmt.

Bestrahlte Seite.

Knorpelfuge. Das Einwandern der Verkalkungsgrenze in den bestrahlten hyalinen Knorpel läßt sich zumindest im 4-Wochen-Intervall gut demonstrieren. 2 Wochen p.inj. macht der Abstand zwischen der neuen Verkalkungsfront und dem Schwärzungssaum nur etwa eine Saumbreite aus, 4 Wochen p.inj. liegt der Schwärzungssaum jedoch überall deutlich innerhalb der verkalkten Knorpelplatte. Die durchschnittliche Entfernung beträgt dann rund 50μ, allerdings mit sehr großen Schwankungen, da die Verkalkungsgrenze unregelmäßig vorrückt (Abb. 30). Im autoradiographischen Bild entsteht der unmittelbare Eindruck, daß der hyaline Knorpel durch diesen Vorgang allmählich aufgebraucht wird..
Metaphyse. Entsprechend der primären Einlagerung 5 Wochen p.irr. kommen intensivere Markierungen erwartungsgemäß nur spärlich vor und finden sich vorwiegend in den atypischen Neubildungen. Die sekundären Verlagerungen fallen hier unterschiedlich aus: Die

markierten dystrophischen Verkalkungsherde liegen nach der 2. Woche noch oberflächlich und sind erst nach der 4. Woche stärker umbaut. Dagegen erscheinen am Metaphysenausgang heiße Markierungen sehr weit im Inneren von atypischen Spongiosabälkchen und grobfibrösen Knochenauflagerungen der Compacta; die frühere Beobachtung, daß die Neubildungen in dieser Region sehr rasch proliferieren können, wird dadurch bestätigt. In der Tibiametaphyse waren 2 und 4 Wochen p.inj. die typischen Reparationserscheinungen zu beobachten. Das Vorliegen entsprechender Markierungssäume, durch nachfolgende Auflagerung von normalem Knochengewebe weit ins Trabekelinnere verschoben, weist auf einen relativ frühen Beginn der Reparation in diesem Fall hin. Ähnliches gilt für den periostalen Knochenanbau am Schaft der Metaphyse, wo die regelmäßig vorgefundenen Auflagerungen ebenfalls vereinzelt mit dem zugehörigen Schwärzungssaum unterlegt waren. Im Inneren der Compacta, vor allem im Femur, findet sich schließlich eine große Zahl von Feldern hoher diffuser Aktivität, die durch Kittlinien abgegrenzt sind. Sie entsprechen ehemaligen Gefäßkanälen und kleinen Markräumen, die im Markierungszeitraum aufgefüllt wurden und so zur weiteren Verdichtung der Compacta beitragen (Abb. 31).

Epiphyse. Hier liegen die Verhältnisse insofern anders, als die relativ geringe Schädigung zur Zeit der Injektion einen direkten Seitenvergleich mit der Kontrolle zuläßt. Die Untersuchung zeigt allerdings, daß die primäre Einlagerung - in Form von Anbausäumen - umfangmäßig bereits etwas zurückbleibt und die Anbausäume zudem nicht mehr gleichmäßig in der Epiphyse verteilt sind, sondern sich vorwiegend auf die Knochenbälkchen der Peripherie beschränken. Die Verlagerung ins Trabekelinnere nimmt von der 2. zur 4. Woche deutlich zu, doch kann von einer allgemeinen Spongiosaerneuerung keine Rede mehr sein. Auf eine quantitative Bestimmung wurde daher verzichtet.

Unbestrahlte Seite.

Epiphyse. In der Tibiaepiphyse sind die Markierungssäume vorwiegend auf die Knochenbrücke zwischen den beiden Kondylen konzentriert. Dagegen läßt die Gleichmäßigkeit der Verteilung und Verlagerung in der Femurepiphyse darauf schließen, daß die Spon-

giosa noch einem generalisierten Umbau unterliegt. Eine genaue Bestimmung war wegen der geringen Verlagerung erst 4 Wochen p.inj. möglich und ergab folgende Werte:

Gesamtknochen (Flächeneinh.)	neugebildeter Kn. (Flächeneinh.)	neugebildeter Kn./ Gesamtknochen	Mittelw. in %
1.621	0.238	0.147	14.3
1.752	0.244	0.139	

Metaphyse. Aus der Verschiebung der Knorpelmarkierungen geht deutlich hervor, wie sich das Längenwachstum gegenüber den um 5 Wochen jüngeren Tieren der Gruppe B verlangsamt hat. Im einzelnen wurden folgende Werte bestimmt (in μ):

Wochen p.inj.	2	4
Tibia	890	1600
Femur	780	1380

Diese Werte entsprechen recht gut dem erwarteten Längenzuwachs, wenn sie sinngemäß, d.h. dem höheren Tieralter entsprechend in die Kurve der Text-Abb. 2 (S.35) eingefügt werden.
Im übrigen spiegelt sich die Verlangsamung von Resorption und Knochenumbau im Zustand der metaphysären Markierungen wider. Sie sind sehr viel vollständiger erhalten, als dies bei den jüngeren Tieren der Gruppe B der Fall ist, auch wenn als Vergleichsbasis nicht das entsprechende Markierungsintervall, sondern der gleiche Betrag der Knorpelverschiebung zugrundegelegt wird. Ebenso bleibt im Schaft von der ursprünglichen endostalen Markierung wesentlich mehr erhalten. Die Untersuchung des Markierungsmusters zeigt, daß grundsätzlich die gleichen Änderungen der Schaftform wie früher ablaufen, die Umbaugeschwindigkeit aber stark verlangsamt ist.

V. Veränderungen des ^{45}Ca-Einbaus in der Frühphase der Strahlenschädigung (Versuch D).

Im Einbauversuch wurden 1 Woche p.irr. bereits deutliche autoradiographische Veränderungen angetroffen. Es liegt daher nahe, schon in den ersten Tagen p.irr. nach dem Beginn dieser Veränderungen zu suchen. Im gleichen Zusammenhang gibt es Hinweise in der Literatur, die histologisch und röntgenmorphologisch eine Verdichtung der Epi- und Metaphyse während der ersten Woche belegen. Meist wurde daraus eine Erhöhung der Ca-Einbaurate abgeleitet, die unter Umständen schon Stunden nach der Bestrahlung einsetzen soll (4,10,21); auch die Ergebnisse von Alizarinuntersuchungen wurden in diesem Sinn gedeutet (9,21). Von anderen Autoren wird dagegen auf die Möglichkeit einer frühzeitigen Hemmung der Resorption hingewiesen (38).
Zur Klärung dieser Frage wurde der ^{45}Ca-Einbau am 1., 2., 3. und 4. Tage p.irr. untersucht (jeweils 1 Versuchstier). Wegen der Kürze der Intervalle wurde ^{45}Ca nicht 48 sondern 24 Stunden ante mortem injiziert, in einem Fall also unmittelbar anschließend an die Bestrahlung. Von den präparierten Beinknochen wurden vor der Weiterbehandlung Röntgenaufnahmen angefertigt.

Ergebnisse:

Unbestrahle Seite.

Die Verkürzung der Markierungszeit bringt einige Abweichungen vom bekannten Einbauschema der Kontrollen mit sich. So erscheinen vor allem sämtliche Osteoidverkalkungssäume deutlich schmäler und akkumulieren insgesamt weniger ^{45}Ca als beim 48 Stunden-Einbau. In der Epiphyse fehlen Säume daher oft ganz oder sind nur schwach ausgeprägt, vermutlich weil hier die Knochenanbaurate relativ langsam ist. In der Metaphyse treten die Knorpelmarkierungen als intensivste Schwärzungen noch wesentlich deutlicher hervor als sonst und im endostalen Einbaumuster des Schafts erscheinen die einzelnen Saumstrecken in schärferer Auflösung. Die Verschiebung des markierten Knorpels fällt der Markierungsdauer entsprechend geringer aus. Die Werte der Tibiaepiphysenfuge werden in Tab. 4 als Vergleichswerte zur bestrahlten Seite aufgeführt. Abgesehen von dem merkwürdig niedrigen Wert des 1.

Tages ergibt sich ein Mittelwert von 165 µ/24 Std., der mit den früheren Ergebnissen recht gut übereinstimmt (s. Text-Abb. 1). Die Knorpelmarkierungen liegen damit noch innerhalb der primären Spongiosa (Abb. 8), was auch erklärt, warum der markierte Knorpel in größerem Umfang erhalten ist. Da im Gegensatz zu den Osteoidverkalkungszonen die Intensität der Knorpelmarkierungen und auch ihre Ausdehnung auf den einzelnen Knorpelbälkchen gegenüber dem 48 Stunden-Einbau nicht wesentlich eingeschränkt erscheint, ist anzunehmen, daß die Verkalkung von Knorpelelementen bereits in weniger als 24 Stunden weitgehend zum Abschluß kommt.
Die diffuse Aktivität liegt ähnlich wie beim 48 Stundeneinbau, möglicherweise sogar noch etwas höher. Die Relation der Abstufungen ist erhalten. Nach den geltenden Vorstellungen über das kinetische Verhalten einer injizierten ^{45}Ca-Dosis ist denkbar, daß 24 Stunden p.inj. die diffuse Markierung noch einen gewissen Anteil an austauschbarem ^{45}Ca enthält.

Bestrahlte Seite.

1 Tag p.irr. kommt es zu einer schweren Knochenmarksreaktion in der gesamten bestrahlten Region. Die autoradiographischen Veränderungen beschränken sich auf ein geringes Zurückbleiben in der Verlagerung des markierten Knorpels (s.u.).

2 Tage p.irr. sind leichte Veränderungen im Verteilungsmuster nachweisbar. Sie betreffen die Knorpelmarkierungen, die in ihrer Konfiguration noch mit der Kontrolle übereinstimmen und auch in ihrer Verschiebung nur geringfügig zurückbleiben, aber in ihrer Intensität etwas erniedrigt sind.
In der Metaphyse sind bei normaler räumlicher Verteilung die Markierungen etwas abgeschwächt. Auch am Endost, und zwar vor allem in der Tibia, sind bis zur Grenze des Bestrahlungsfeldes die Einlagerungssäume etwas verwischt und ebenfalls abgeschwächt. Im histologischen Bild (Alcian-Pikrofuchsin) entspricht diesem Befund eine leichte Auflösung der endostalen Oberfläche durch beginnende fibröse Knochenbildung.

3 Tage p.irr. zeigt die Verschiebung des markierten Knorpels einen deutlichen Rückstand. Die Konfiguration der Knorpelmarkierungen ist weiterhin normal, die Intensität dagegen erniedrigt.

In der Metaphyse schließt das Schwärzungsmuster der Spongiosa nicht an die Knorpelmarkierungen an, wie dies in der Kontrolle der Fall ist, sondern beginnt erst nach einer unregelmäßig breiten Markierungslücke. Die Grenze der Knochenapposition ist also eher etwas von der Knorpelfuge weggerückt, wodurch das Verteilungsbild der ganzen Metaphyse etwas ungeordnet wirkt. Dagegen erscheint die Intensität der einzelnen Markierungssäume wie auch die Gesamteinlagerung von ^{45}Ca nur mäßig abgeschwächt. Aus den Autoradiogrammen, noch deutlicher aus dem histologischen Bild (Alcian-Pikrofuchsin) geht eindeutig eine Verdichtung der subepiphysären Zone hervor. Es handelt sich dabei sowohl um eine Vermehrung von Knorpelresten als auch - in der Ossifikationszone - von Knochenmasse, die sich auch röntgenologisch zu erkennen gibt (s.u.).
Am Endost bestehen die gleichen Veränderungen wie am 2. Tag. Während somit die Ca-Einlagerung in den Knochenneubildungszonen der Meta- und Diaphyse allgemein rückläufig ist, verhält sich die Epiphyse konträr. Im Unterschied zur Kontrolle treten an der Basisplatte und der Spongiosa deutliche Anbausäume auf; gleichsinnig reagieren auch die Patellae (Abb. 32, 33). Gleichzeitig erscheinen in diesen Knochenteilen die Trabekel etwas verplumpt.

4 Tage p.irr. sind praktisch die gleichen Veränderungen zu verzeichnen, einschließlich der vermehrten Anbautätigkeit in den bestrahlten Epiphysen. Ein weiteres Absinken der Ca-Einlagerung ist nur am Tibiaschaft zu beobachten.
Der weitere Rückgang des Längenwachstums spiegelt sich in der Verschiebung der Knorpelmarkierungen, wobei die Abstandsbestimmung wegen der geringen Beträge etwas unsicher wird. Aus Tab. 4 geht hervor, daß die Wachstumshemmung bereits am ersten Tag einsetzt und in den folgenden Tagen zunimmt. Auffallend niedrige Werte werden am 1. Tag sowohl auf der bestrahlten wie auch auf der unbestrahlten Seite gemessen.

Tage p.irr.	unbestr. Tibia	bestr. Tibia
1	13o	110
2	175	160
3	17o	125
4	150	65 ?

Tab. 4. Verschiebung der Knorpelmarkierungen über 24 Stunden in der proximalen Tibia (in μ).

Wie schon erwähnt, wird in der Metaphyse am 3. und 4. Tage eine leichte Sklerosierung der subepiphysären Zone beobachtet, die vermutlich auf einer beginnenden Resorptionsstörung beruht. Sie manifestiert sich im Röntgenbild als mäßige Zunahme der Verschattung, die in der Tibia bandförmig abgesetzt, im Femur mehr diffus erscheint. Dagegen lassen sich röntgenologische Seitenunterschiede in den Epiphysen nicht nachweisen.

VI. Das Verhalten der außerhalb des Strahlenfeldes gelegenen Epimetaphysen

Bisher war nur von den massiven Schädigungen die Rede, die in der bestrahlten Region angetroffen werden. Da der Knochen ein funktionelles Ganzes darstellt, liegt der Gedanke nahe, im partiell bestrahlten Knochen auch außerhalb des Bestrahlungsfeldes nach einer Veränderung zu suchen. Es könnte sich dabei grundsätzlich um eine Mitbeteiligung oder um einen Kompensationsvorgang handeln, also um eine Reaktion in katabolem oder anabolem Sinn, oder ganz allgemein um Veränderungen, die nicht in dieser Weise alternativ einzuordnen wären.
Aus dieser Sicht wurde das Längenwachstum als gut meßbare Größe bereits mehrfach untersucht. Reidy und Mitarbeiter (56) fanden bei jungen Hunden, daß nach Bestrahlung der proximalen Tibiaepiphyse der zu erwartende Wachstumsrückstand durch verstärktes Wachstum der distalen Epiphyse großenteils kompensiert wird. Durch Einoperieren einer Metallmarke in den Tibiaschaft war es möglich, den Wachstumsanteil der Epiphysenfugen röntgenometrisch getrennt zu bestimmen; danach betrug bei 1200 R der Wachstumsausfall der proximalen Epiphysenfuge 68 %, der Wachstumsrückstand der ganzen Tibia aber nur 24 %. Bei der Ratte sind die knieseitigen Epiphysenfugen von Tibia und Femur die am schnellsten wachsenden und am längsten tätigen Knorpelfugen überhaupt. Ebenfalls mit Hilfe eines Metallmarkers hat Hinkel (37) im Rattenfemur erstmals den Wachstumsbeitrag der distalen Epiphysenfuge zu rund 73 %, der proximalen zu 27 % bestimmt. Bei Bestrahlung der distalen Fuge mit steigenden Dosen ging das Wachstum des Femurs stark zurück, um sich schließlich der Wachstumskurve des proximalen Femurendes anzugleichen. Ob diese allerdings von der Wachstumskurve der unbestrahlten Seite abweicht, wird nicht erwähnt. Dagegen postuliert Gauwerky (28) verstärktes Wachstum der distalen Rattentibia nach fraktionierter Bestrahlung im Kniegelenk, allerdings nicht aufgrund direkter Messungen. Er findet, daß zur Erreichung eines bestimmten Wachstumsrückstandes die Fraktionierungsfaktoren bei höheren Dosen unerwartet stark ansteigen und macht das Einsetzen kompensatorischer Wachstumsvorgänge dafür verantwortlich.

Die Abstandsmessung der Knorpelmarkierungen im Autoradiogramm bei den Tieren der Gruppe B bietet die Möglichkeit, die Wachstumsleistung in den nichtbestrahlten Epiphysenfugen direkt zu bestimmen. Diese Methode hat zudem den Vorteil, daß sie auch dann noch genau ist, wenn das Längenwachstum sehr klein ist oder nicht mit vollen Betrag in den Längenzuwachs des Knochens eingeht, wie dies beim Caput und Trochanter major der Fall ist, deren Wachstumsrichtung von der Längsachse des Femur abweicht.
Um die Beurteilung einer möglichen Strahlenreaktion nicht allein auf das Längenwachstum zu beschränken, wurden bis zur 15. Woche p.irr. auch die Tiere des Einbauversuches auf Seitenunterschiede im autoradiographischen Bild der ^{45}Ca-Einlagerung hin untersucht. Außerdem wurde bei allen Tieren das histologische Bild zum Seitenvergleich herangezogen. Die Untersuchung schließt sowohl das proximale Femurende mit Caput und Trochanter major wie auch die distale Tibia mit den beiden Gelenkköpfen des Sprunggelenks ein.

1. Morphologisches Kriterium im caput femoris ist zunächst der Reifegrad der Epiphyse. Sie besteht zum Zeitpunkt der Bestrahlung fast durchweg noch aus großblasigem Knorpelgewebe, das oben an den Gelenkknorpel, unten an den hyalinen Knorpel der Epiphysenfuge angrenzt. Seine Grundsubstanz zeichnet sich gegenüber diesen Knorpelgeweben durch eine deutliche diffuse Markierung aus. Der Ersatz des Knorpels durch knöcherne Spongiosa beginnt kurze Zeit später, stets an der Trochanterseite der Epiphyse, und ist bis zum Ende des 4. Monats in jedem Fall abgeschlossen. Während der Markraum zunächst noch durch ein embryonales Bindegewebe mit zahlreichen Klasten und Osteoblasten ausgefüllt wird, überwiegt später hämopoetisches Mark. Seitenunterschiede in dieser Entwicklung kommen durchaus vor, scheinen aber insgesamt zufällig verteilt. Das gleiche gilt für den Zustand der Epiphysenfuge, die einer deutlichen Altersregression unterliegt, bis sie etwa im 7. Monat allmählich resorbiert wird, sowie für das autoradiographische Bild der ^{45}Ca-Einlagerung in die Wachstumszone und Metaphyse des Caput.
Bei der Bestimmung des Längenwachstums ist zu berücksichtigen, daß die Epiphysenfuge an der Peripherie, also in Schaftnähe, zu diesem Zeitpunkt kaum noch wächst, sich aber in der Mitte in einer charakteristischen Linie über die Knorpelmarkierungen erhebt. Die

Abstandsmessung wird daher im zentralen Teil der Epiphysenfuge vorgenommen und liefert dort einen Maximalwert, der keineswegs als Längenzuwachs der Caputmetaphyse (Collum) anzusehen ist. Es wurde jedoch sichergestellt, daß die Seitenunterschiede sich nicht auf diesen Punkt beschränken, sondern gleichsinnig auch für die übrigen Teile der Knorpelfuge gelten. Folgende Werte wurden im einzelnen ermittelt:

Wochen p.inj.	1	2	3	4	6	9
re. Caput (bestr.Seite)	420	380	550	975	810	1065
li. Caput (unbestr.Seite)	340	430	550	940	780	940

Tab. 5. Wachstum der Epiphysenfuge des Caput Femoris (in µ).

Auf gleichmäßige Orientierung der Knochenpräparate und Einhaltung der Schnittebenen wurde sorgfältig geachtet, so daß methodische Fehler als Ursache für die Seitenunterschiede weitgehend ausgeschlossen werden können.

2. Die Epiphyse des Trochanter major ist zum Zeitpunkt der Bestrahlung bereits völlig durch knöcherne Spongiosa und hämopoetisches Mark erschlossen. Die Epiphysenfuge wird früher zurückgebildet und resorbiert als im Femurkopf, und zwar beginnend etwa im 5. Monat. Ein sicherer Seitenunterschied, etwa im Sinne verzögerter Rückbildung, läßt sich nicht feststellen, ebensowenig ein deutlicher Unterschied im autoradiographischen Bild des Ca-Einbaus. Dagegen bietet die Abstandsmessung der Knorpelmarkierungen ähnliche Verhältnisse wie im Femurkopf, wobei die Werte hier eher über die ganze Länge der Epiphysenfuge gelten:

Wochen p.inj.	1	2	3	4	6	9
re. Trochanter (bestr.Seite)	370	400	440	560	570	960
li. Trochanter (unbestr.Seite)	350	400	440	560	520	830

Tab. 6. Wachstum der Epiphysenfuge des Trochanter major (in µ).

3. Einige Millimeter distal der Verschmelzung mit der Fibula teilt sich die Tibia in die beiden Köpfe der Malleolengabel. Beide Knorpelfugen stehen zum Zeitpunkt der Bestrahlung allerdings kurz vor ihrer Schließung. So geht der endgültige Wachstumsbeitrag über 300 µ nicht hinaus und läßt auch kaum einen Seitenvergleich zu. Die ehemalige Lage der Knorpelfugen bleibt auch nach dem Verschwinden des Knorpels noch lange Zeit durch die Anordnung der Trabekel und Häufung der Osteoblasten zu erkennen. Autoradiographisch fällt der lebhafte Ca-Einbau in die Spongiosa auf. Seitenunterschiede im autoradiographischen Bild sowie in der Rückbildung des Knorpels kommen nicht selten vor, scheinen aber wiederum gleichmäßig verteilt.
Von allen Kriterien ergibt somit das Längenwachstum von Caput und Trochanter des Femur am ehesten verwertbare Hinweise auf strahlenbedingte Seitendifferenzen. Dieser Effekt ist allerdings sehr gering und zeigt nicht die zu erwartende Zunahme über die Versuchsdauer. Er stellt möglicherweise den Versuch einer kompensatorischen Wachstumssteigerung dar, der infolge der fortgeschrittenen Regression der Knorpelfugen im Ansatz stecken bleibt. Für eine eventuelle Nachprüfung empfiehlt sich jüngeres Tiermaterial, bei dem die Knorpelfugen noch längere Zeit aktiv sind.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die vorliegende autoradiographische Untersuchung gibt erstmals eine detaillierte topographische Beschreibung der strahleininduzierten Mineralstoffwechselstörungen, die im lokal röntgenbestrahlten Knochen nach höherer Einzeldosis ablaufen. Diese Fragestellung ist bisher vorwiegend unter quantitativen Aspekten durch tracer-Untersuchungen an veraschten Knochenproben bearbeitet worden. Dabei informieren Aktivitätsmessungen im wesentlichen über den globalen Umfang der Veränderungen, machen also Aussagen über das integrale Verhalten größerer Knochenabschnitte. Erst im räumlichen Bild des Autoradiogramms können zusätzlich auch die einzelnen Vorgänge differenziert werden, die in ihrer Summe den gemessenen Strahleneffekt ausmachen. Wie sich der Schädigungsablauf aus dieser Sicht darstellt, soll im folgenden diskutiert werden.
Wenn sich die Untersuchungsergebnisse über die Einlagerung und Retention von ^{45}Ca naturgemäß auch ergänzen, so scheint eine getrennte Besprechung doch aus Gründen der Übersichtlichkeit angebracht. In beiden Fällen lassen sich aus dem komplexen Bild der Veränderungen wichtige Grundzüge herausstellen.

I. Einfluß der Strahlenschädigung auf den ^{45}Ca-Einbau

1. Das Schwinden der o s t e o b l a s t i s c h e n T ä t i g k e i t wird für das Verteilungsbild, aber auch für die Gesamteinlagerung an ^{45}Ca in den ersten Wochen am wichtigsten. Von der Knorpelverkalkung einmal abgesehen, repräsentieren alle heißen Einlagerungen die Verkalkung von Osteoidsäumen und spiegeln in ihrer Intensität und Ausdehnung die osteoblastische Aktivität wider.
Eine Reaktion auf die einmalige Bestrahlung mit 2ooo R ist am 1. Tag p.irr. autoradiographisch noch nicht nachweisbar. Dies könnte bedeuten, daß der ausdifferenzierte Osteoblast in seiner Funktion nicht unmittelbar beeinträchtigt wird, aber auch, daß eine eventuell beginnende Verzögerung in der Produktion verkalkungsfähiger Matrix durch das Vorliegen von präformiertem unverkalktem Osteoid zunächst noch nicht in Erscheinung tritt. Erst nach einer Latenz von etwa 2 Tagen setzt in der Metaphyse und am Endost des Schafts, also den Gebieten mit der lebhaftesten Knochenneubildung, eine merkliche Abnahme der Ca-Einlage-

rung ein. In der Metaphysenspongiosa dauert es noch 2 bis 3 Wochen, bis der reguläre Knochenanbau völlig erlischt, während er zu dieser Zeit am Metaphysenausgang und vor allem am Endost der Diaphyse noch tätig ist. Erst etwa 6 Wochen nach Bestrahlung wird er auch in der Diaphyse bis an die Grenze des Bestrahlungsfeldes endgültig eingestellt. Es entsteht so der Eindruck, daß die Schädigung zuerst in der Metaphyse manifest wird und von dort nach distal zur Diaphyse fortschreitet.
Ein ähnlich progredienter Verlauf wurde bisher von Sams (61) hinsichtlich des Verhaltens der alkalischen Phosphatase in der Mäusetibia beobachtet: 2 Wochen nach einmaliger Bestrahlung mit 2ooo R konnte in der Metaphysenspongiosa kaum noch Enzymaktivität registriert werden, während am Endost und Periost der Compacta nur relativ geringe Abweichungen vom Kontrollwert zu verzeichnen waren. Analog dazu berichtet Blackburn (11), daß nach einmaliger Bestrahlung der Mäusetibia mit 1ooo R der Osteoblastenuntergang in der Metaphyse der morphologischen Schädigung des Endosts weit vorauseilt.
Für diese zeitlich unterschiedliche Suppression des Knochenanbaus in den einzelnen Anbaugebieten bieten sich verschiedene Erklärungen an. Trotz der nachgewiesenen "homogenen Durchstrahlung" ist zunächst ursächlich an eine unterschiedliche Dosisverteilung zu denken. Die Strahlenbelastung der im Knochen eingeschlossenen Weichteile wird bekanntlich stark von den im mineralisierten Gewebe erzeugten Sekundärelektronen bestimmt. Ihre Energie und damit ihre mittlere Reichweite ist bei konventioneller Röntgenstrahlung groß genug, daß auch entfernter liegendes Gewebe noch mitbestrahlt wird. Das osteogene Gewebe zwischen den dicht gestellten Trabekeln der Metaphyse liegt daher stärker im Kreuzfeuer der vom Knochen ausgehenden Sekundärelektronen als das nur einseitig von Knochen begrenzte Endost der Diaphyse. Die komplexen Zusammenhänge, die zwischen der Qualität der Primärstrahlung und der lokalen Energieabsorption bestehen, sind von Woodard und Spiers (72), Woodard und Laughlin (73) und Matsuzawa e.a. (5o) am Beispiel phosphatase-aktiver Bezirke in der Mäusetibia analysiert worden. Wenn man die mitgeteilten Ergebnisse allerdings auf eine 3oo kV-Strahlung überträgt, ergibt sich wahrscheinlcih nur eine geringfügig höhere Energieabsorption für die Markräume und das osteogene Gewebe der Metaphyse.

Mag diese Mehrbelastung an sich auch gering sein, so ist doch zu bedenken, daß sie auf ein Gewebe besonders hoher Reproduktivität trifft. Für das mesenchymale Zellmaterial der endochondralen Verknöcherungszone sind auffallend hohe Teilungsraten nachgewiesen worden (42, 74). Unter der Knorpelfuge wird täglich eine Zone von 150 bis 200 µ Breite der Ossifikation neu erschlossen und damit eine ausgedehnte Oberfläche von neuen Trabekeln geschaffen, die großenteils mit Osteoblasten besetzt werden muß. Am Endost der Diaphyse dagegen hat der Zellnachschub nur diejenigen Osteoblasten zu ersetzen, die sich zu Osteocyten differenzieren und im neuangebauten Knochen eingeschlossen werden (53, 54). Die Zellproliferation, die vorwiegend auf der Stufe der Präosteoblasten erfolgt, fällt entsprechend geringer aus (74). Unter dem Aspekt, daß die Präosteoblasten und ihre Vorläufer sich wahrscheinlich aus dem mesenchymalen Zellmaterial der Gefäßadventitia speisen (67), erscheint auch die Strahlenreaktion des Knochenmarks in einem neuen Licht. Die schwere Markschädigung einschließlich der Gefäßveränderungen hält sich in den ersten Wochen auffallend genau an die Ausbreitung der Metaphysenspongiosa, während das Diaphysenmark zunächst nur wenig betroffen ist. Für diesen Zusammenhang mit der Gefäßsituation spricht auch, daß die Knochenbildung am Endost zur gleichen Zeit erlischt, wenn in der Diaphyse die Markaplasie eintritt, was etwa in der 6. Woche p.irr. der Fall ist.

Ungeachtet der graduellen Unterschiede führt die Bestrahlung in der Meta- und Diaphyse bereits in den ersten Tagen zu einer deutlichen Einschränkung der osteoblastischen Aktivität. Umso mehr fällt auf, daß es in der Epiphyse vorübergehend sogar zu einer Stimulierung des Knochenanbaus kommt, die sich sowohl in einer Intensivierung der Schwärzungssäume als auch in einer Verlängerung der einzelnen Saumstrecken, also einer Ausweitung der Anbaugebiete äußert. Drei von insgesamt 4 Tieren, die zwischen dem 3. und 5. Tag nach Bestrahlung untersucht wurden (Versuch D und A) zeigten diesen Effekt; eine weitere Bestätigung liefert die planimetrisch nachweisbare Mehrbildung von neuem Knochen im gleichen Zeitraum, auf die später noch eingegangen wird. Demnach beginnt die Anbausteigerung am 3. Tag nach Bestrahlung und ist zeitlich etwa auf die Dauer einer Woche be-

grenzt. Im weiteren Verlauf verhält sich die Anbautätigkeit dann unauffällig, bis sie von der 6. Woche an, zugleich mit dem Untergang des Epiphysenmarks, endgültig eingestellt wird (Versuch A und C). Völlig gleichartig reagieren interessanterweise auch die Patellae, die den Epiphysen in ihrer anatomischen Struktur etwa gleichzusetzen sind (Abb. 32, 33). Vorderhand bleibt offen, über welchen Mechanismus die Osteoblasten der Epiphyse, die im Vergleich zu den Blasten des Endost und der Metaphyse eine relativ langsame Osteoidproduktion aufweisen, durch die Bestrahlung zu einer Funktionssteigerung angeregt werden können.

2. Noch während die osteoblastische Aktivität in der Metaphyse und Diaphyse auf dem Rückzug ist, treten hier a t y p i s c h e K n o c h e n n e u b i l d u n g e n verschiedener Art auf, die alle eine starke Entdifferenzierung in der Osteogenese aufweisen. Sie umfassen ein weites Spektrum von sehr primitiven Formen, die an dystrophische Verkalkung erinnern, bis zu relativ reifen Formen, die etwa die Struktur von Geflechtknochen erreichen. Gemeinsam ist ihnen als kollagenes Fasergerüst ein Netzwerk von groben, unregelmäßig durchflochtenen Faserbündeln, während normales Knochengewebe auf feinen, parallel geschichteten Fibrillen aufbaut (13). In der englischen Literatur werden sie daher auch als "fibrous bone" bezeichnet, was meist ebenso umfassend und ohne weitere Klassifizierung gebraucht wird wie der Ausdruck "atypical bone", den nur Baserga e.a. (6) für Knochenformen mit auffallender Produktion von organischer Matrix reservieren. Histochemische Untersuchungen aus den letzten Jahren weisen darauf hin, daß sie in relativ hoher Konzentration alkalische und saure Phosphatase enthalten. (3o, 61).
Das Wachstum dieser atypischen Knochenformen erfolgt im allgemeinen interstitiell; der Knochen wird zunächst lückenhaft angelegt und erreicht erst nach und nach durch Auffüllung eine kompaktere Struktur. Bei den besonders primitiven Neubildungen in den knorpelnahen fibrotischen Teilen der Metaphyse beginnt die Verknöcherung sogar in Form spritzerartiger oder herdförmiger Kalkablagerung in die kollagenen Faserbündel, die von den knöchernen Oberflächen ausstrahlen und die Trabekel

in dichten Zügen umlagern oder Brücken zwischen benachbarten Trabekeln bilden. Die interstitielle Entstehungsweise spiegelt sich auch im autoradiographischen Bild der Ca-Einlagerung. Während bei der regulären Knochenapposition die Anbauzonen durch den typischen Schwärzungssaum markiert sind, führt die Anlage atypischer Knochenformen in der Regel nur zu einer flächig-diffusen Schwärzung, die zudem - in Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit - meist nur geringe Intensität besitzt. Nicht selten kann daher die Abgrenzung der normalen diffusen Reaktion präformierter Knochenteile von der primären Mineralisierung atypischer Formen autoradiographisch schwierig sein und nur nach morphologischen Kriterien erfolgen. Morphologische Gesichtspunkte sprechen auch dafür, daß die Geschwindigkeit der Kalkaufnahme in den atypischen Strukturen von der verzögerten Bildung einer verkalkungsfähigen Grundsubstanz limitiert wird. So zeichnen sich reifere Knochenformen, die vorwiegend in der distalen Metaphyse vorkommen und eine reichliche Osteoidbildung aufweisen, im allgemeinen durch eine rapide Ca-Aufnahme und entsprechend heiße Markierung aus.

Der Höhepunkt der atypischen Knochenbildung liegt in einer mittleren Phase der Strahlenschädigung, die beginnend in der 4. bis 6. Woche p.irr. sich über einen Zeitraum von 2 bis 3 Monaten erstreckt. Atypische Knochenformen stellen in dieser Zeit in der Metaphyse, zum Teil auch in der Epiphyse einen erheblichen Anteil der Knochenmasse. Infolge ihrer langsamen durchschnittlichen Wachstumsgeschwindigkeit spielen sie für die Gesamtaufnahme an ^{45}Ca jedoch keine größere Rolle. Die durch sie hervorgerufene Sklerosierung ist vor allem als Zeichen der schwerwiegenden Resorptionsstörung zu werten, die das Gleichgewicht zu Ungunsten des Knochenabbaus verschiebt.

3. Fast regelmäßig kommen schließlich in der Metaphye R e p a r a t i o n s p r o z e s s e in Gang, die primär das Knochenmark betreffen, auf dem Boden der Knochenmarkregeneration aber auch zu einem Umbau der Spongiosa und zur Wiederherstellung einer gewissen Spongiosaarchitektur führen. Die Knochenbildung wird dabei wieder durch reguläre osteoblastische Anbautätigkeit übernommen, so daß im Autoradiogramm aufs neue Schwärzungssäume erscheinen. Den Anfang macht stets die mediale

Seite der Tibiametaphyse. Beginnend in der 5. bis 6. Woche p.irr. breitet sich hier entlang der Compacta bis hinauf zur Epiphysenfuge wieder normales Knochenmark aus, das in der Folgezeit langsam in die fibrotisch-aplastischen Markräume der übrigen Metaphyse vorwächst. Gleichzeitig mit dem Vordringen des Markgewebes erfolgt eine Resorption der alten sklerotischen Teile, deren Rudimente umgehend durch Auflagerung von neuem Knochengewebe wieder zu großen locker stehenden Trabekeln ergänzt werden. Man findet daher vor allem an der jeweiligen Reparationsgrenze eine lebhafte Anbautätigkeit, die sich im Autoradiogramm durch eine gewisse Häufung der Schwärzungssäume zu erkennen gibt. Aber auch im sklerotischen Teil der Metaphyse entlang dieser Umbaufront wird eine Vermehrung von intensiven flächigen Schwärzungen beobachtet. Wahrscheinlich verbessert das Vordringen der Knochenmarkregeneration auch im aplastischen Mark mit einer beschränkten Reichweite die nutritive Situation und führt damit zu einer Aktivierung der atypischen Knochenbildung. Das histologische und autoradiographische Bild wird durch diese Entwicklung über Monate geprägt: Neben den sklerotischen Teilen der Metaphyse mit ihrer flächigen Kalkeinlagerung entsteht ein wachsendes Areal umgebauter Spongiosa mit saumförmigen Schwärzungen; in der Grenzzone treten beide Arten von Schwärzungsmaxima als Zeichen vermehrter Anbautätigkeit etwas gehäuft auf.
Abgesehen von der Reparationsfront erscheint die Knochenapposition in der bereits rekonstruierten Spongiosa relativ gering, vor allem wenn man bedenkt, daß mit der Restitution des Knochenmarks auch die zellulären Voraussetzungen zur Knochenbildung voll gegeben sind. Möglicherweise wirkt sich der anhaltende Wachstumsstop und das Fehlen der endochondralen Ossifikation dahingehend aus, daß der neuen Spongiosa von vornherein nur noch die Rolle einer Stützspongiosa, analog der normalen Epiphysenspongiosa, zufällt. Tatsächlich entspricht sie in ihrer Struktur und Umbaugeschwindigkeit, aber auch im Umfang der ^{45}Ca-Einlagerung weit eher der Epiphyse als der Metaphyse der unbestrahlten Seite. Der große Rückstand im Aktivitätseinbau zur Kontrollmetaphyse gleicht sich erst aus, wenn auch auf der gesunden Seite das Längenwachstum völlig eingestellt ist und die Metaphysenspongiosa im Zuge der Altersinvolution stark zurückgebildet wird. Die Reparation der bestrahlten und die Alters-

regression der unbestrahlten Seite konvergieren dann auf einen histologisch und autoradiographisch sehr ähnlichen Endzustand hin.
Während sich in dieser Hinsicht in den späten Stadien (22 Wochen p.irr. und danach) Tibia und Femur praktisch gleich verhalten, besitzt die Tibia im Beginn der Reparation stets einen deutlichen Vorsprung. Die Erholungsvorgänge konzentrieren sich hier zunächst auf die mediale Seite der Metaphyse, wo mit guter zeitlicher Übereinstimmung auch der Schwerpunkt der Knorpelregenerate beobachtet wird. Für den Spongiosaumbau wie für die Knorpelregeneratbildung bildet die Wiederbesiedlung mit Knochenmark die notwendige Voraussetzung (62). Dabei kann in der Tibia die Markregeneration eher vom ungeschädigten Diaphysenmark aus erfolgen, weil die histologische Schädigungsgrenze meist in geringem Abstand vom Metaphysenausgang verläuft, während in der Femurmetaphyse Erholungsinseln des Knochenmarks mit entsprechendem Spongiosaumbau durch eine breite aplastische Zone vom Diaphysenmark getrennt sind und auch erst zu einem späteren Zeitpunkt auftreten. Die Kontrolle der unmittelbar p.irr. angefertigten Röntgenaufnahmen ergibt übrigens, daß im Femur die histologische Schädigungsgrenze mit der Bestrahlungsgrenze übereinstimmt, während sie in der Tibia eher proximal davon, also noch innerhalb des Bestrahlungsfeldes verläuft.
Von Baserga, Lisco und Cater (6), die unter sehr ähnlichen Versuchsbedingungen die Entstehung von Osteosarkomen untersucht haben, wird die Frage diskutiert, ob sich zwischen dem Ablauf von Erholungsvorgängen und dem Autreten der Knochentumoren eine Beziehung herstellen läßt. Auch in unsrem Tiermaterial sind an einem späten Versuchspunkt in auffallend hoher Inzidenz Osteosarkome beobachtet worden, und zwar auch in Knochen mit deutlich ablaufender Reparation. Entsprechend der Versuchsanordnung, die einen für die Onkogenese wichtigen Zeitraum nicht erfaßt (22. Woche bis 16. Monat p.irr.), war das Tumorwachstum allerdings stets zu weit fortgeschritten, um feinere Zusammenhänge mit dem Reparationsablauf erkennen zu lassen. Aus dem gleichen Grund kann auch die Bedeutung von eventuell persistierenden Strahlenschäden nicht beurteilt werden. Verdächtig von den in früheren Stadien beobachteten Veränderungen scheinen aber am ehesten die schnell wachsenden Trabekelgruppen am Metaphysen-

ausgang (Nähe der Bestrahlungsgrenze!), deren auffallende Proliferationstendenz bereits von Dahl (21) erwähnt wird.
4. Von den Zonen aktueller Knochenneubildung und hoher ^{45}Ca-Konzentration hebt sich der präformierte Knochen im Autoradiogramm durch seine vergleichsweise niedrige d i f f u s e M a r k i e r u n g ab. Auch dieses ^{45}Ca erweist sich als fest eingebaut, wenn in genügendem Abstand, z.B. 48 Stunden nach Inkorporation untersucht wird. Nach den bestehenden Vorstellungen ist jedoch davon auszugehen, daß die diffuse Markierung nur zu einem geringen Teil einem echten Minderalzuwachs im bestehenden Knochengewebe entspricht, der überwiegende Anteil aber aufgrund primärer Austauschvorgänge fixiert wird (52). Demnach setzt sich das zirkulierende ^{45}Ca im Knochengewebe zunächst sehr schnell ins Gleichgewicht mit den Kationen, die in der Hydratationsschicht des einzelnen Apatit-Kristalls adsorbiert sind, und wird dann schrittweise gegen stabiles Ca der oberflächlichen und tieferen Schichten des Kristallits ausgetauscht. Entscheidend für die Fixierung einer größeren Menge von ^{45}Ca ist hierbei, daß dieser Austausch innerhalb weniger Stunden, also noch in der Phase hoher Serumaktivität erfolgt, so daß er für einmalig in tracer-Dosen injiziertes ^{45}Ca praktisch irreversibel ist.
Eine wesentliche Voraussetzung für die ersten Schritte des Ionenaustauschs bildet demnach die ungehinderte Diffusion im interkristallinen Raum,wie sie vor allem in jungem, wenig kalkdichtem Knochengewebe gegeben ist. Mit steigendem Alter nimmt der Mineralgehalt eines Knochenelements zu, und zwar über eine Größenzunahme der einzelnen Apatitkristalle. Dies muß allmählich zu einer Einengung der Kristallabstände und damit zu einer graduellen Behinderung der Diffusionsmöglichkeit, d.h. der Ca-Affinität führen. An Compactaschliffen von Röhrenknochen, die stets ein ganzes Altersspektrum Havers'scher Osteone enthalten, konnte die reziproke Abhängigkeit der ^{45}Ca-Affinität vom Knochenalter und Kalkgehalt quantitativ belegt werden; altes, vollmineralisiertes Knochengewebe zeigte dabei stets die niedrigste Ca-Affinität (1, 23). Die Reproduzierbarkeit dieser Beziehung am devitalisierten und sogar am mikroincinerierten Knochenpräparat beweist nachdrücklich, daß die chemisch-mineralogischen Gegebenheiten des Knochengewebes dabei die ausschlaggebende Rolle spielen.

Die normale Verteilung unterschiedlich markierter Knochenteile im wachsenden Röhrenknochen gibt ebenfalls ein anschauliches Beispiel dieser Alterabhängigkeit. Am intensivsten markiert sind die rezenten Knochentrabekel der subepiphysären Metaphysenspongiosa sowie die knorpelnahen bzw. subendostalen Abschnitte der Compacta, während die Epiphysenspongiosa und vor allem die Compacta der Diaphyse infolge ihres durchschnittlich höheren Knochenalters eine entsprechend niedrigere Markierung aufweisen. Ganz generell sinkt die Intensität der diffusen Markierung im Skelett alter Tiere infolge stark eingeschränkter Umbautätigkeit ab.

Die irreversible Einstellung des Längenwachstums und die Sterilisierung des osteogenen Gewebes führt im bestrahlten Knochen zwangsläufig zum Abbruch der natürlichen Rejuvenation. Betroffen davon ist vor allem das Knochengerüst der Metaphyse, in dem sich die ursprünglichen lokalen Altersunterschiede rasch einebnen, bis schließlich eine mehr oder weniger einheitliche Überalterung der bestrahlten Region resultiert. Parallel mit der zunehmenden Lebensdauer der einzelnen Knochenstrukturen erfolgt zweifellos auch ein allgemeiner Anstieg der Mineralisationsdichte, der sich autoradiographisch als Abnahme der Ca-Affinität zu erkennen gibt. Wie zu erwarten, wird dieser Effekt zuerst in den normalerweise hochreaktiven Trabekeln der proximalen Metaphyse sichtbar. Ihre Markierungsdichte sinkt bis zur 3. Woche p.irr. auf einen Wert, der nur noch um einen Faktor 2 bis 3 über der Markierungsdichte der alten Diaphysencompacta liegt. In gleicher Weise nimmt auc h im kompakten Knochen das Aktivitätsgefälle von den knorpelnahen Abschnitten zur Diaphyse deutlich ab. Diese Depression setzt sich weiter fort und bedingt über einen Zeitraum von etwa 2 Monaten eine weitgehende Nivellierung der diffusen Aktivität im spongiösen und kompakten Knochen der Metaphyse und Diaphyse.

Die grundsätzliche Gültigkeit dieser Beziehung muß nicht bedeuten, daß der Mineralisationsgrad auch im einzelnen mit der beobachteten Ca-Affinität überall streng korreliert ist. Eine Beeinflussung der diffusen Aktivität durch weitere Strahleneffekte ist durchaus denkbar. In Frage kommt als zusätzlicher Faktor vor allem die infolge der Markaplasie sicher bestehende

Ischämie; eine starke Drosselung der Blutzirkulation führt ebenfalls zu einer Einschränkung der Diffusion und täuscht damit eine zu niedrige Ca-Affinität vor.

5. Die präparatorische Verkalkung der E p i p h y s e n - f u g e im wachsenden Röhrenknochen verbindet sich mit einer beträchtlichen Einlagerung von ^{45}Ca. Im Unterschied zu den Osteoidsäumen wird die entsprechende Markierung über einen Zeitraum von 48 Stunden infolge der hohen Wachstumsgeschwindigkeit räumlich weit auseinander gezogen. So erscheint über den verkalkten Knorpelresten auf einer Länge von etwa 100 µ eine sehr intensive Markierung, die bisher als "Knorpelmarkierung" apostrophiert wurde. Sie entspricht allerdings nur der Knorpelzone, die in den ersten Stunden nach Injektion, also in der Zeit hoher Serumaktivität gebildet und mit Apatit inkrustriert wird. Wenn man davon ausgeht, daß die Neubildungsrate des Knorpels rund 200 µ pro Tag beträgt, muß ihre Entstehungszeit in die ersten 12 Stunden nach Injektion fallen; da sie in ihrem distalen Anteil wahrscheinlich präformierte, zum Zeitpunkt der Injektion bereits teilverkalkte Knorpelreste mitenthält, die ebenfalls noch markiert werden, reduziert sich ihre Entstehungszeit noch weiter auf schätzungsweise 9 Stunden. Diese Tatsache erklärt, daß eine Verkürzung des Intervalls zwischen Injektion und Tötung von 48 auf 24 Stunden (Versuch D) auf die Ausdehnung der Knorpelmarkierung ohne Einfluß ist.
Infolge der raschen Knorpelproliferation bildet sich nach kurzer Zeit, also z.B. noch im 24 Stunden-Intervall, unter der Epiphysenfuge bereits eine neue Reihe relativ aktivitätsarmer Knorpelspongiosa, die den markierten Knorpel scheinbar nach distal verlagert. Über 48 Stunden wird dieser Effekt so groß, daß die Wachstumsgeschwindigkeit der Epiphysenfuge daraus ausreichend genau bestimmt werden kann. Wie aus Text-Abb. 1 hervorgeht, beträgt sie bei den jungen Tieren (Alter 8 Wochen) rund 400 µ in 2 Tagen, wird aber mit zunehmendem Alter rasch kleiner. Dieser Rückgang wirkt sich nicht nur auf die Verschiebung sondern auch auf die Ausdehnung der Knorpelmarkierung aus, die sich in der Folgezeit verschmälert und immer näher an die Epiphysenfuge heranrückt, bis sie im hohen Alter schließlich zu einem einfachen Schwärzungssaum reduziert ist, der dem hyalinen Knorpel unmittelbar anliegt (Abb. 10).

Mit gewissen Einschränkungen können auch die an der bestrahlten Epiphysenfuge beobachteten Veränderungen als Folge einer Einstellung der Knorpelproliferation betrachtet werden, wobei die Entwicklung allerdings auf einen Zeitraum von etwa 1 Woche zusammengedrängt ist. Die erste Reaktion auf die Bestrahlung besteht in einer Abnahme der Knorpelverschiebung am 1. Tag, die wahrscheinlich Ausdruck eines strahleninduzierten Mitoseblocks ist. Die folgenden Tage zeigen eine zunehmende Einschränkung der Knorpelverschiebung gegenüber den Kontrollwerten, beispielsweise am 3. Tag 125 µ gegenüber 17o µ, am 4. Tag 65 µ gegenüber 15o µ auf der unbestrahlten Seite (Versuch D). Am Ende der 1. Woche schließt die Knorpelmarkierung, die nun aus einer breiten Zone verkalkter Grundsubstanz mit mangelhaft eröffneten Knorpelhöhlen besteht, schließlich unmittelbar an den hyalinen Knorpel an (Versuch A). Daß die Längenausdehnung der Knorpelmarkierung zunächst nicht proportional zur Verlangsamung der Knorpelneubildungsrate abnimmt, ist vermutlich wieder auf eine Einbeziehung präformierter Knorpelreste zurückzuführen.

Mit der irreversiblen Sterilisierung der Knorpelfuge am Ende der 1. Woche ist eigentlich zu erwarten, daß auch die Knorpelverkalkung erlischt und die entsprechenden Markierungen aus dem autoradiographischen Bild verschwinden. Überraschenderweise findet sich aber auch in den folgenden Monaten - stets genau an der Grenze des hyalinen Knorpels verlaufend - ein deutlicher Schwärzungssaum, der beweist, daß eine Art rudimentärer Knorpelverkalkung weit über die Sterilisierung der Knorpelfuge hinaus aufrecht erhalten bleibt. Auf Kosten des hyalinen Knorpels entsteht allmählich eine Platte von verkalktem Knorpelgewebe, die wegen der fehlenden Arrosion schließlich beträchtliche Dicke erreicht und stellenweise den ganzen Durchmesser der Epiphysenfuge einnehmen kann. Die beiden Anteile lassen sich jeweils besonders gut im histologischen Präparat durch die selektive Darstellung des verkalkten Knorpels mit der Alcianblaufärbung unterscheiden. Eine ausreichende Differenzierung ist aber auch im Autoradiogramm möglich, so daß bei geeignetem Markierungsmodus - Injektion 5 Wochen p.irr., Tötung 4 Wochen später - das Vorrücken der Verkalkungsfront über den einmal angelegten Schwärzungssaum in den hyalinen Knorpel hinein direkt sichtbar gemacht werden kann (Versuch C).

Aus verschiedenen Gründen ist anzunehmen, daß dieser Verkalkungsvorgang mit dem Mechanismus der normalen Knorpelverkalkung wenig zu tun hat, auch wenn sein geordnetes Fortschreiten auf den ersten Blick eine solche Ähnlichkeit nahelegt. Die präparatorische Verkalkung des normalen Knorpels ist dadurch gekennzeichnet, daß im Zusammenspiel von Chondrocytendifferenzierung und Kapillareinsprossung in der Grundsubstanz die biochemischen Voraussetzungen zur Kalkimprägnation geschaffen werden (68,69). Unter anderem gehört dazu auch die Bereitstellung alkalischer Phosphatase, die sich nach der Bestrahlung rasch erschöpft und schließlich ganz verschwindet (29,61). Da in der devitalisierten, von aplastischem Knochenmark begrenzten Knorpelfuge diese zellulären Voraussetzungen fehlen, ist die beobachtete rudimentäre Verkalkung vermutlich ein rein passiver Vorgang und in der langsamen Addition von Apatitmaterial an den bereits vorhandenen verkalkten Knorpel am ehesten dem Aufwachsen eines Mineralisationskeims vergleichbar. Dabei kann ausgeschlossen werden, daß dieser Vorgang durch eine erhöhte Ca-Affinität des bestrahlten Knorpels begünstig wird, da dieser in seiner Markierung (nur wenig über dem Nulleffekt) durchaus mit dem hyalinen Knorpel der Kontrollseite übereinstimmt. Aufgrund verstärkter Basophilie ist eine solche erhöhte Ca-Affinität verschiedentlich postuliert worden (27, 39, 51).
Bei der großen Zahl in der Literatur mitgeteilter Untersuchungen über den Schädigungsverlauf der Epiphysenfuge fällt auf, daß die Entwicklung einer ausgedehnten verkalkten Knorpelplatte als Strahlenfolge bisher offenbar nicht beobachtet wurde. Im allgemeinen wird beschrieben, daß die sterilisierte Knorpelfuge im Lauf einiger Wochen gegen die Metaphyse hin durch mehr oder weniger breite Knochenauflagerungen abgeschlossen wird. An dieser Stelle kann nicht entschieden werden, ob ausschließlich tierstammspezifische Unterschiede vorliegen oder ob möglicherweise der verkalkte Knorpel gelegentlich nicht identifiziert wurde, weil er sich bei den üblichen Färbungen entweder vom Knochen (bei H.E., PAS) oder vom Knorpel (bei van Gieson und Giemsa) nur wenig abhebt. Einige Abbildungen aus der Literatur scheinen diese Vermutung zu erhärten (z.B. 62, 75). Als besonders geeignete selektive Darstellung darf daher die im methodischen Teil (s.Anh.

S.94) näher beschriebene Kombinationsfärbung mit Alcianblau und Pikrofuchsin bezeichnet werden.

6. Besonders aufschlußreich für den Vergleich mit dem autoradiographischen Verlauf ist eine Reihe q u a n t i t a t i v e r S t o f f w e c h s e l u n t e r s u c h u n g e n über den Ca-Einbau im bestrahlten Knochen. Entsprechende Arbeiten sind von Zuppinger und Minder (76), Kolar und Babicky (45) und Gauwerky (27) am Kniegelenk der Ratte sowie von Wilson (7o, 71) am Kniegelenk der Maus durchgeführt worden. Im Unterschied zum Autoradiogramm, wo die Schwärzung ein Maß für den absoluten Aktivitätsgehalt im Schnitt darstellt, muß bei der Untersuchung veraschter Knochenproben der Nuklidgehalt in Form der spezifischen Aktivität (^{45}Ca/Gesamtcalcium) angegeben werden. Vergleichende Verlaufsbetrachtungen sind aber durchaus möglich.
Zunächst findet sich in der Literatur der interessante Hinweis, daß bei Bestrahlung eines Kniegelenks auch das kontralaterale, unbestrahlte eine gewisse Mitreaktion zeigen kann. Nach den Ergebnissen von Zuppinger und Minder (einmalige Bestrahlung der proximalen Rattentibia mit 2ooo R) sinkt die spezifische Aktivität im Knochen der unbestrahlten Seite während der 1. Woche auf etwa 85 %, erreicht aber am Ende der 2. Woche wieder den Wert der unbestrahlten Kontrollen und verläuft dann weiterhin normal. Kolar und Babicky (45) finden wesentlich stärkere Abweichungen; nach ihren Beobachtungen wird die Normalkurve in großen Schwankungen mehrmals unter- und überschritten und dabei z.B. in der 7. Woche sogar der ursprüngliche Ausgangswert wieder erreicht. Im Gegensatz dazu erscheint in den Autoradiogrammen über die ganze Versuchsdauer eine kontinuierliche altersbedingte Abnahme im unbestrahlten Bein. Dieser Rückgang der Ca-Einlagerung betrifft Knorpel, Osteoid und präformierten Knochen etwa gleichmäßig und erst bei alten Tieren (18 Monate) verschiebt sich der Nuklideinbau anteilmäßig zur diffusen Einlagerungsform. Eventuelle Mitschwankungen müßten demnach auf alle Einbaustätten etwa gleichmäßig verteilt sein. Im Gegensatz dazu beschreibt Sams (61) als enzymhistochemischen Befund eine vorwiegend auf die Knorpelfuge beschränkte Depression der alkalischen Phosphatase (Mäusetibia, 3 Tage nach 2ooo R). Die interessante Frage transitorischer Ca-Einbauschwankungen im kontralateralen unbestrahlten Kniege-

lenk sollte daher letztlich durch simultane Untersuchung der Aktivitätsaufnahme, des autoradiographischen und enzymhistochemischen Verteilungsmusters geklärt werden.
Die Befunde im bestrahlten Knochen zeigen nach vergleichbaren Dosen durchwegs eine rasche Abnahme der spezifischen Aktivität. Nach Kolar und Babicky (einmalige Bestrahlung des Rattenkniegelenks mit 3ooo R) sinkt sie innerhalb der ersten 3 Wochen auf 65 %, bleibt dann bis zur 6. Woche etwa konstant und fällt erst danach weiter ab, so daß sie in der 9. Woche 4o % unterschreitet. Die hierbei verwendete relativ weiche Strahlung (5o keV) scheint allerdings keine homogene Durchstrahlung zu garantieren. Während der autoradiographische Verlauf den initialen Abfall mit dem Schwinden der heißen Einlagerungen gut erklärt, gibt er keinen Hinweis, wieso die spezifische Aktivität zwischen der 3. und 6. Woche konstant bleiben und danach in 3 Wochen auf fast die Hälfte absinken kann.
Nach Zuppinger und Minder (einmalige Bestrahlung der Rattentibia mit 2ooo R) fällt die spezifische Aktivität in der 1. Woche auf 65 %, steigt in der 2. Woche wieder auf 7o % und sinkt dann stetig zur 6. Woche auf 5o % des Ausgangswertes. Ungewöhnlich ist hier nach dem raschen initialen Abfall der intermittierende Anstieg in der 2. Woche und die Tatsache, daß die spezifische Aktivität in der 1. und 3. Woche p.irr. praktisch gleiche Werte ausweist. Läßt man dies außer acht, ist die Übereinstimmung mit dem autoradiographischen Befund allerdings ausgezeichnet. Der Kurvenverlauf bis zur 2. Woche entspricht dann im wesentlichen dem Schwinden der osteoblastischen Tätigkeit, während der anschließende flachere Kurventeil nur noch das Verhalten der diffusen Aktivität wiedergibt.
Diese Annahme scheinen auch weitere Ergebnisse derselben Arbeit zu bestätigen; wenn die Dosisabhängigkeit der ^{45}Ca-Aufnahme am kritischen Versuchspunkt, nämlich 2 Wochen p.irr. untersucht wird, so zeigt sich folgendes: Die Nuklidaufnahme fällt mit steigender Dosierung ab und nähert sich schließlich einem Grenzwert von 64 %, der endgültig bei 4ooo R, praktisch bereits bei 2ooo R erreicht wird. Insgesamt beschreibt den Kurvenverlauf eine Funktion der Form $K = K_a + K_z \cdot e^{-aD}$, die den Ca-Einbau in eine strahlensensible, dosisabhängige Fraktion K_z und eine grössere, praktisch

strahlenresistente Fraktion K_a (64 %) zerlegt. Von diesen beiden Komponenten soll nur K_z für den Einbau auf direkte zelluläre Leistung angewiesen sein; wenn der allgemeine Zelluntergange 2 Wochen nach Bestrahlung diesen Weg verschließt, entspricht jede später gemessene Einlagerung der "nicht vitalen" Fraktion K_a allein. Wie der oben beschriebene zeitliche Verlauf der Ca-Aufnahme nach 2ooo R zeigt, nimmt der Nuklideinbau allerdings auch nach der 2. Woche noch deutlich ab, so daß sich damit auch die zunächst unbeeinflußbare Fraktion K_a als strahlenempfindlich erweist, wenn der gesamte Verlauf der Schädigung einbezogen wird.

Diese Überlegungen lassen es gerechtfertigt erscheinen, die Terme K_z und K_a im wesentlichen der heißen bzw. diffusen autoradiographischen Einbauform zuzuordnen. Die heißen Einlagerungen benötigen als unmittelbare Voraussetzung die Knorpelproliferation und Osteoidproduktion, also zelluläre Leistungen, während die diffuse Aktivität vorwiegend von den mineralogischen Eigenschaften des vorliegenden Knochens bestimmt wird und auch auf hohe, sterilisierende Dosen zunächst nur geringfügig reagiert. Abweichend von der Definition der Fraktion K_a wird sie im weiteren Verlauf allerdings über die Insuffizienz des Knochenumbaus ebenfalls von zellulärer Schädigung beeinflußt. Abgesehen davon muß die Beteiligung zellulärer Leistungen bei der Vermittlung des "vitalen" Ca-Einbaus nach den autoradiographischen Befunden etwas anders als in der Interpretation von Zuppinger und Minder gesehen werden: Ihre Bedeutung liegt offenbar in der Bereitstellung einer verkalkungsfähigen organischen Matrix, während der Verkalkungsvorgang selbst ohne unmittelbares zelluläres Eingreifen spontan abläuft.

Wilson (7o, 71) hat den ^{32}P-Einbau in das Kniegelenk der Maus nach 2ooo R untersucht. Das Verhältnis der spezifischen Aktivität von bestrahlter zu unbestrahlter Seite erreicht ein Minmum von o.55 in der 5. bis 6. Woche und steigt danach sehr langsam wieder an. Wenn die Ergebnisse von Kolar und Babicky (45) und Zuppinger und Minder (76) in Form dieses Quotienten dargestellt werden, so ergibt sich übereinstimmend ein Minimum von o.55 bis o.6 in der 5. bis 6. Woche, gefolgt von einem leichten Wiederanstieg in den folgenden Wochen. Es ist allerdings fraglich, ob dieser Wiederanstieg bei älteren Tieren eine echte Tendenz zur Normalisierung des Ca-Einbaus bedeutet, oder nicht viel-

mehr durch eine ebenfalls in den Quotienten eingehende altersbedingte Regression der unbestrahlten Seite vorgetäuscht wird. Die autoradiographischen Befunde zeigen auf der bestrahlten Seite zwischen der 4. und 6. Woche ein Minimum des Ca-Einbaus ohne nennenswerte Erholung im weiteren Verlauf, während auf der unbestrahlten Seite zur gleichen Zeit der altersbedingte Rückgang deutlich einsetzt (Lebensalter 12 Wochen). Auch die Tatsache, daß die Ca-Aufnahme bis Versuchsende auf beiden Seiten wieder annähernd vergleichbaren Werten zustrebt (22 Wochen p.irr.), liegt weniger an einer Reparation der Strahlenschäden als vielmehr an der starken Altersinvolution der unbestrahlten Seite.

Dies schließt nicht aus, daß der beobachtete Wiederanstieg des Quotienten bei sehr jungen Tieren möglicherweise einem echten Erholungsvorgang entspricht. Gauwerky (27) hat die ^{32}P- sowie die ^{45}Ca-Aufnahme in die Rattentibia am 2o. Lebenstag untersucht und findet nach anfänglicher Depression einen Wiederanstieg. Das Minimum liegt dabei übrigens sehr früh (17. bzw. 3o. Tag p.irr) und ist noch ausgeprägter (ca. o.4). Auch der Wiederanstieg zeigt für die beiden Radionuklide, die gewöhnlich im Hinblick auf den Mineralstoffwechsel als äquivalent angesehen werden, bemerkenswerterweise ein deutlich divergentes Verhalten (z.B. o.45 und o.65 am 5o. Tag p.irr.).

Eine grundsätzliche Bemerkung zur Methodik von tracer-Versuchen, die zur Bestimmung des Ca-Einbaus die einmalige Injektion des Nuklids verwenden, scheint an dieser Stelle angebracht. Wie bereits besprochen, wird aus kinetischen Gründen des Ionenaustausches sehr viel mehr ^{45}Ca in Form der diffusen Aktivität in den präformierten Knochen eingelagert, als dem tatsächlichen Mineralzuwachs entspricht; für den überwiegenden Anteil an ^{45}Ca werden stabile Ca-Ionen zurückgetauscht, die dem Nachweis entgehen. Nach den Abschätzungen von Arnold e.a. (3) kann daraus eine erhebliche Überbestimmung des Ca-Einbaus resultieren, vor allem wenn bei adulten Tieren mehr als die Hälfte des gesamtinkorporierten ^{45}Ca in Form der diffusen Aktivität gespeichert wird. Es erscheint auch aus diesem Grund nur mit kritischer Einschränkung möglich, die Größe des Nuklideinbaus nach Bestrahlung als quantitatives Maß für die vitale Schädigung der Knochenfunktion zu verwenden.

II. Strahleninduzierte Wachstumsstörungen und ihre Bedeutung für den Mineralumsatz

Die kontinuierlichen und raschen Umbauvorgänge, denen der wachsende Röhrenknochen unterliegt, führen mit zunehmendem Abstand von der Inkorporation zu charakteristischen Veränderungen im primär angelegten ^{45}Ca-Verteilungsmuster. Durch Anbau und Resorption werden die markierten Knochenelemente aus ihrer Position verschoben und allmählich rarefiziert, lassen aber für einige Zeit die ursprüngliche Knochengestalt noch so weit erkennen, daß der schrittweise Formwandel des Knochens daraus rekonstruiert werden kann. Die Beobachtungen am Aktivitätsmuster geben ferner darüber Aufschluß, auf welchem Wege und in welchem zeitlichen Ablauf das eingebaute ^{45}Ca aus dem Knochen wieder eliminiert wird. Die folgenden Kapitel behandeln daher vor allem die strahleninduzierten Veränderungen des Knochenwachstums und die damit verknüpften Störungen der Mineralkinetik.

1. Für die quantitative Beurteilung der Strahlenwirkung besonders geeignet ist das L ä n g e n w a c h s t u m. Seit Perthes 19o4 (55) und Försterling 19o6 (24) über die Wachstumshemmung von Extremitätenknochen beim Tier berichtet haben, ist dieses Thema experimentell - und wegen seiner praktischen Bedeutung für die Strahlentherapie - auch klinisch ausführlich bearbeitet worden. Die von uns verwendete autoradiograpische Methode, die die Wachstumsleistung einer Epiphysenfuge aus der scheinbaren Verlagerung der Knorpelmarkierungen mikrometrisch zu bestimmen erlaubt, wurde bereits 195o von Leblond e.a. (46) eingeführt und kurz danach auch von Comar e.a. (2o) aufgegriffen. Methodische Fortschritte, vor allem eine wesentliche Verbesserung der autoradiographischen Auflösung, ermöglichen mittlerweile nicht nur präzisere Messungen, sondern auch die Fortführung der Untersuchung über einen längeren Verlauf, weil auch vereinzelte, im Schaft der Diaphyse persistierende Knorpelreste für die Bestimmung ausreichen. Damit konnte das Längenwachstum über die ganze Versuchsdauer, die etwa die 8. bis 17. Lebenswoche überspannt, mit guter Genauigkeit verfolgt werden.
Wie die entsprechende Wachstumskurve in Text-Abb. 2 zeigt, kommt es auf der unbestrahlten Seite in diesem Zeitraum bereits zu

einer entscheidenden altersbedingten Retardierung des Längenwachstums, so daß der wöchentliche Längenzuwachs in der 17. Woche nur noch einen unbedeutenden Betrag ausmacht. Als erste Ableitung dieser Wachstumskurve sind die 48-Stunden-Wachstumsraten anzusehen, die bei den Tieren der Gruppe A nach dem gleichen Prinzip bestimmt wurden. Die Kurve der Text-Abb. 1 wurde daher zum Vergleich graphisch integriert (Text.-Abb. 2). Ihre ausgezeichnete Übereinstimmung bestätigt die Zuverlässigkeit der Methode auch bei sehr kleinen Verschiebungswerten.
Auf der bestrahlten Seite erreicht die Verschiebung in der 1. Woche noch knapp die Hälfte des Normalwertes, nimmt aber in den weiteren Intervallen bis zur 9. Woche nicht mehr zu. Damit erweist sich, daß der Wachstumsstop bereits innerhalb der 1. Woche eintritt und irreversibel ist. Der endgültig geleistete Wachstumsbeitrag ist in der Tibia und im Femur etwa gleich und beträgt durchschnittlich 75o µ. Während dieser Wert von Tier zu Tier etwas unterschiedlich ausfällt (Tab. 1), verläuft in der einzelnen Metaphyse die Reihe der Knorpelmarkierungen stets parallel zur Epiphysenfuge. Dies läßt den Schluß zu, daß die Sterilisierung sehr gleichmäßig über die ganze Knorpelfuge hin abläuft.
In der Literatur wird für einen Dosisbereich von 2ooo bis 3ooo R übereinstimmend ein kompletter Wachstumsstop innerhalb der 1.-2. Woche beschrieben (4, 5, 21, 33, 37, 51), zum Teil wird er sogar bereits nach 15oo bis 16oo R registriert (11,21). Lediglich Baserga e.a. (6) finden auch nach 3ooo R (γ-Strahlung einer Iridiumquelle) eine Wiederaufnahme des Wachstums nach 6o Tagen, wobei als histologisches Substrat eine Spaltung der Knorpelfuge mit annähernd normaler Proliferation der proximalen Hälfte beobachtet werden konnte. Da bei den meisten Untersuchungen dieser Art trotz lokaler Bestrahlung des Kniegelenks der Wachstumsverlauf des ganzen Knochens der Bestimmung zugrunde gelegt wird, bringen ihre Ergebnisse das Verhalten der bestrahlten Epiphysenfuge nicht so eindeutig zu Ausdruck wie das Autoradiogramm. Für den Vergleich besonders aufschlußreich ist daher eine Untersuchung von Sissons (65), die im Dosisbereich von o bis 16oo R am Rattenfemur nach Einoperieren einer Metallmarke in den Schaft vorgenommen wurde. Das Wachstum der distalen Epiphysenfuge, das

auf diese Weise röntgenometrisch separat verfolgt werden konnte, ergab für die beiden Extrema 0 bzw. 1600 R einen Verlauf, der den Kurven der Text-Abb. 2 entspricht. Nach 800 R wurde in diesem Fall eine vorübergehende Verlangsamung mit späterem Wiederanschluß an die normale Wachstumsrate, nach 1200 R eine dauernde Verlangsamung, jedoch kein Wachstumsstillstand beobachtet. Im übrigen scheinen ganz allgemein zur Wiederaufnahme des Längenwachstums nach passagärem Wachstumsstop vor allem jüngere Tiere befähigt, bei denen zwar der Schwellenwert zur Erzielung eines Wachstumseffektes niedriger liegt, die Erholungsfähigkeit jedoch größer ist (37).

2. Wachstum und Umbau der M e t a p h y s e sind so unmittelbar dem Längenwachstum des Knochens untergeordnet, daß sie von der Sterilisierung der Knorpelfuge ebenfalls entscheidend betroffen werden. Die Metaphyse verliert mit dem Wachstumsstop ihre eigentliche physiologische Funktion, die darin besteht, die Knorpelproliferation über den Prozeß der endochondralen Verknöcherung in einen Längenzuwachs der Diaphyse zu übertragen. Mit diesem Vorgang verbindet sich ein kontinuerlicher Auf- und Abbau von Spongiosa und kompaktem Knochen, d.h. ein lebhafter Umsatz von Knochengewebe und damit von Knochenmineral.
Die Größe dieses Umsatzes im unbestrahlten Knochen kann in erster Näherung aus der Wachstumsgeschwindigkeit erschlossen werden. Die unbestrahlte Tibiametaphyse verlagert sich in den ersten 4 bis 5 Wochen nach Markierung rund einmal um ihre eigene Länge nach proximal, kenntlich daran, daß Rudimente der ursprünglichen heißen Knorpelmarkierung dann in Höhe des neuen Metaphysenausgangs vorgefunden werden. Ihre Knochenmasse hat sich in dieser Zeit notwendigerweise mindestens einmal erneuert; aus zusätzlichem Spongiosaumbau und der umfangreichen Schaftverlegung kann jedoch ein weit größerer Knochenumsatz abgeleitet werden.

Mit der Sterilisierung der Knorpelfuge wird diese permanente Erneuerung unterbrochen. Im Lauf der 1. Woche p.irr. wird lediglich eine Spongiosazone von ca. 750 µ Ausdehnung unter der Epiphysenfuge noch neu gebildet, danach ist die Metaphyse

in ihrer Lage endgültig fixiert. Die Behinderung des Strukturumsatzes, die sich zwangsläufig daraus ergibt, kann jedoch isoliert nicht beurteilt werden. Ihr überlagert sich die zelluläre Strahlenschädigung der Osteoklasten und des osteogenen Gewebes, die wiederum nicht unerheblich von den regressiven Veränderungen des Knochenmarks beeinflußt wird. Aus diesen Strahleneffekten resultiert schließlich eine weitgehende Stagnation des lokalen Knochenumbaus, begleitet von gewissen Verschiebungen im Umbaugleichgewicht.

Über das Verhalten der Knochenneubildung informieren im wesentlichen die Befunde des Einbauversuchs. Demnach zeichnet sich eine Hemmung der Knochenapposition bereits in den ersten Tagen nach Bestrahlung ab, die innerhalb von 2 bis 3 Wochen in eine weitgehende Suppression des regulären Knochenanbaus in der ganzen Metaphyse übergeht. Die Knochenneubildung wird im weiteren Verlauf durch atypische Formen abgelöst, wobei die Produktionsrate insgesamt jedoch gering bleibt. Auf der anderen Seite entwickelt sich aber eine schwerwiegende Resorptionsstörung, so daß die Metaphyse trotz mangelhafter Knochenneubildung allmählich einer zunehmenden Verdichtung und schließlich einer massiven Sklerosierung anheimfällt. Auch hierfür finden sich erste Anzeichen bereits wenige Tage nach Bestrahlung, und zwar in Form einer deutlichen Vermehrung der alcianpositiven Knorpelreste und der knöchernen Strukturen im Bereich der primären Spongiosa und der endochondralen Ossifikation, die sich auch röntgenologisch in einer gewissen Verdichtung dieser Zone äußert. Besonderes anschaulich wird der Ausfall der Resorption schließlich dadurch demonstriert, daß die endochondralen Knorpel- und Knochenmarkierungen, die normalerweise rasch aus der Metaphyse verschwinden, auf der bestrahlten Seite bis zur 6. Woche nach Injektion noch ohne wesentliche Rarefikation in ihrem ursprünglichen Umfang vorliegen. Aus diesem Befund kann die zunehmende Überalterung des metaphysären Knochens direkt abgelesen werden.
Partiell tritt eine Änderung dieser Situation ein, wenn von der 6. Woche p.irr. an umschriebene Spongiosaareale, zunächst stets in der Tibiametaphyse, durch Reparationsvorgänge aufgelöst und anschließend mit annähernd normaler Architektur wieder aufgebaut werden. Der spongiöse Umbau erreicht in diesen

Bezirken wieder volles Gleichgewicht, die Umbaurate bleibt jedoch gering und wird der Kontrollseite zunächst nicht vergleichbar.

Nach den Ergebnissen der Literatur ist die Sklerosierung der Metaphyse nach Bestrahlung mit Wachstumsstop als typisch anzusehen. Sowohl für die Ratte als auch für andere Tierspezies wird allgemein eine Vermehrung der knöchernen Struktur beschrieben, die sich auch röntgenologisch als Verdichtung der Metaphyse zu erkennen gibt (4, 6, 17, 21, 27, 38). Dieser Befund wird allerdings nicht einheitlich gedeutet. Während ihm einige Autoren eine Steigerung des Knochenanbaus oder zumindest für die Frühphase sogar eine vermehrte Kalkeinlagerung zugrundelegen (9, 1o, 21, 25), stellen andere wie Blackburn e.a. (11) und vor allem Hinkel (39) die Resorptionsstörung ausdrücklich in den Vordergrund. Die Vermutung liegt nahe, daß es sich weniger um divergente Verlaufsformen als vielmehr um eine unterschiedliche Beurteilung des histologischen Bildes handelt; die autoradiographisch nachgewiesene Drosselung des Knochenumbaus mit überwiegender Insuffizienz der Resorption dürfte wahrscheinlich die häufigste Strahlenreaktion darstellen. Eindeutig andere Verlaufsformen sind jedenfalls nur ausnahmsweise beobachtet worden. Sams (61, 62) findet beispielsweise in der Mäusetibia nach 2ooo R eine ausgeprägte Rarefizierung der Spongiosa, die fast sofort nach Bestrahlung einsetzt und histochemisch mit einer starken Verminderung der alkalischen Phosphatase, aber keiner wesentlichen Beeinträchtigung der Osteoklasten und der sauren Phosphatase einhergeht.

3. Es soll noch einmal festgehalten werden, wie sich die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen der bestrahlten und unbestrahlten Metaphyse auf die langfristigen Veränderungen im Verteilungsmuster auswirken, weil die weitgehende S t r u k t u r g e b u n d e n h e i t des Ca-Umsatzes darin sehr gut zum Ausdruck kommt.

Auf der unbestrahlten Seite entwächst die Metaphyse im Lauf von 4 bis 5 Wochen dem Bereich der ursprünglichen endochondralen und endostalen Markierungen, die zudem durch Resorption und Umbau rasch eliminiert werden. Unter der vorrücken-

den Epiphysenfuge bilden sich im gleichen Zeitraum neue Metaphysenabschnitte, die bereits von Grund auf mit der spezifischen Aktivität des Serums verkalken und so eine homogene, relativ hohe diffuse Markierung erfahren. Auf diesem Weg wird dem Knochen wieder eine beachtliche Aktivitätsmenge neu zugeführt und mit charakteristischer Gleichverteilung eingebaut. Mit fortschreitendem Längenwachstum erliegen auch diese homogen markierten Teile einem kontinuierlichen Umbau bzw. werden durch neue Strukturen ersetzt, so daß die durchschnittliche spezifische Aktivität der wachsenden Metaphyse mit einer gewissen Verzögerung der Abnahme der Serumaktivität folgt. Die ständige Reinkorporierung von Aktivität in neuentstehendes Knochengewebe bedeutet nichts anderes als die Wiederverwertung von ^{45}Ca, das ubiquitär im Skelett durch Abbau markierter Knochenteile mobilisiert und über den Blutkreislauf wieder allgemein verfügbar wird.

Wie gründlich diese Reutilisation vor allem bei der jungen Ratte ist, belegen einige Untersuchungen an Knochenasche. Durch sorgfältige Auftrennung der Tibia in mehrere Segmente haben Likins e.a. (47) nachgewiesen, daß 3o Tage nach Beendigung einer längeren Markierungsperiode die inzwischen neugebildete Metaphyse in ihrer spezifischen Aktivität bis auf 7o % an die ursprüngliche Metaphyse herankommt. Der Aktivitätsverlust des ganzen Knochens wird durch solche Wiedereinbauvorgänge so gering, daß Jeffay e.a. (4o) daraus fälschlicherweise sogar auf das weitgehende Fehlen von Resorptionsvorgängen im Skelett der jungen Ratte geschlossen haben.

Auf der bestrahlten Seite ist infolge der stark eingeschränkten Knochenneubildung die Neueinlagerung von ^{45}Ca im Sinne der Wiederverwertung nur von untergeordneter Bedeutung. Das Aktivitätsmuster wie auch die Gesamtaktivität wird durch den zur Zeit der Markierung angelegten Knochen bestimmt, der mindestens bis zur 6. Woche p.irr. weitgehend erhalten ist. Neben den heißen Markierungen persistieren dabei auch Bezirke mit sehr niedriger diffuser Aktivität wie z.B. die präformierten Schaftteile, so daß analog zum Einbaumuster die Aktivitätsverteilung sehr heterogen bleibt. Für den Aktivitätsverlauf wird hier die lange Lebensdauer primär markierter Knochenelemente ausschlaggebend: Aus dem autoradiographischen Bild läßt sich abschätzen,

daß die durchschnittliche spezifische Aktivität der Metaphyse sehr viel langsamer absinkt als auf der unbestrahlten Seite. Andererseits beweist die hohe Retention von primär inkorporiertem ^{45}Ca in Zusammenhang mit der geringen Reinkorporation einen sehr geringen Ca-Umsatz.

Einige Untersuchungen an Knochenasche erlauben auch hier den Vergleich mit quantitativen Ergebnissen. So wurde von Kolar und Babicky (43, 44) im Dosisbereich 750 bis 5000 R die Abnahme der spezifischen Aktivität in der bestrahlten und unbestrahlten Tibiaepimetaphyse verfolgt. In deutlicher Dosisabhängigkeit bis zu 5000 R verläuft sie auf der bestrahlten Seite von Anfang an verzögert; beispielsweise beträgt das Verhältnis der unbestrahlten zur bestrahlten Seite 2 Wochen p.irr. (3000 R) rund 0.7. Gauwerky (27) findet bei sehr jungen Tieren unter sonst vergleichbaren Bedingungen mit ^{32}P einen entsprechenden Quotienten von 0.75, bei sehr alten Tieren von 0.95. Mit der Verlangsamung der Resorptions- und Umbauvorgänge, die im Alter die unbestrahlte Seite den Bedingungen der bestrahlten Seite annähert, dürfte diese "Altersregression der Schädigungsmöglichkeit" (28) hinreichend erklärt sein.

Wie wichtig die qualitativen Aussagen des Autoradiogramms ganz grundsätzlich für die Deutung von Aktivitätsmessungen sind, zeigt auch eine Betrachtung von Zuppinger und Minder (77) über die Kinetik der Retention von ^{45}Ca in der normalen Epimetaphyse der Ratte. Für die proximale Tibia finden sie einen Kurvenverlauf der Aktivitätsabnahme, der angenähert aus zwei Exponentialfunktionen zusammengesetzt ist. Unter der ausschließlichen Annahme von Austauschvorgängen kommen sie notwendigerweise zu zwei Calcium-Kompartments verschiedener Größe und Austauschgeschwindigkeit und schließen daraus letztlich auf zwei unterschiedlich feste Bindungsformen für ^{45}Ca im Apatitkristall. Diese formale Behandlung genügt dem Kurvenverlauf, beschreibt aber nicht die im Strukturumbau verankerten gegenläufigen Bewegungen der Ca-Ausscheidung und Reinkorporation; beispielsweise wird hier vernachlässigt, daß die Metaphyse in mehrwöchigem Abstand von der Markierung ihren Aktivitätsgehalt ausschließlich der Reutilisation verdankt.

Eine solche Betrachtungsweise bezieht sich offensichtlich auf ältere Arbeiten von v. Hevesy (34, 35), Singer und Armstrong (63) sowie Singer e.a. (64), die von der Annahme ausgehen, daß die Ca-Kinetik einzelner Knochen und Knochenteile oder auch des Gesamtskeletts durch Austauschvorgänge bestimmt wird. Dies trifft nur zu für Knochengewebe mit weitgehend ruhendem Umbau, wie z.B. manche Schaftteile, wo der langsame Rücktausch von ^{45}Ca ins Serum sogar photometrisch aus dem Autoradiogramm bestimmt wurde (66). Für Knochenabschnitte mit raschem Umbau, wie z.B. die Metaphyse, haben Comar e.a. (2o) aber bereits 1954 festgestellt, "daß die Elimination des Radionuklids weit weniger durch langfristige Austauschvorgänge als vielmehr durch Resorption der markierten Strukturen erfolgt". Dies widerspricht keineswegs der Beobachtung, daß der spongiöse Knochen zumindest an den kurzfristigen Austauschvorgängen stärker beteiligt ist als der Skelettdurchschnitt (7), sondern besagt nur, daß die Austauschvorgänge durch den Strukturumbau überholt werden.

4. Eine quantitative Aussage über den Strahleneffekt ließ sich unerwarteterweise auch in der E p i p h y s e machen. Hier war bereits im Einbauversuch überraschend eine Stimulierung des Knochenanbaus nachgewiesen worden, die sich nun auch als Mehrzuwachs von neuem Knochen bestätigen ließ. Da die Epiphysenspongiosa nur verhältnismäßig langsam umgebaut wird und sich ihre Gesamtmasse dabei praktisch nicht ändert, ist der wachsende Anteil von neugebildetem Knochen anhand der Verlagerung der Markierungssäume besonders gut zu verfolgen. Mit der planimetrischen Bestimmung des Gesamtknochens und des neugebildeten Knochens in Ausschnitten des Autoradiogrammes hat man ein relativ einfaches Mittel zur Hand, die Erneuerung der Spongiosa zu erfassen. Eine solche direkte Bestimmung ist offenbar auch für die normale Epiphyse bisher nicht durchgeführt worden.
Den entsprechenden Verlauf in der unbestrahlten Femurepiphyse zeigt die Text-Abb. 3 (S.38). Man erkennt, daß die Kurve der Spongiosaerneuerung nach steilem Anstieg in der 1. Woche p. inj. im Lauf der 2. Woche (1o. Lebenswoche) deutlich umbiegt

und danach bis zur 6. Woche (14. Lebenswoche) einem nahezu linearen Verlauf folgt. Demnach sind es in der 9. Lebenswoche noch etwa 2o %, von der 11. Woche an nur noch rund 2.5 % der ursprünglichen Spongiosa, die pro Woche durch neuen Knochen ersetzt werden. Wenn man berücksichtigt, daß im Lauf der Zeit auch der neue Knochen in zunehmendem Maß in die Resorption einbezogen werden muß, ist vor allem der lineare Verlauf von der 11. zur 15. Woche überraschend. Er scheint darauf hinzudeuten, daß der Spongiosaumbau in diesem Zeitraum keiner kontinuierlichen Altersabnahme unterliegt, sondern nach einer rasch ablaufenden Umstellung in der 1o. Lebenswoche über längere Zeit wieder mit einer langsameren, aber konstanten Rate weitergeführt wird; eine zwischen der 13. und 17. Lebenswoche vorgenommene Bestimmung (Versuch C) zeigt sogar einen relativ hohen Wert der Spongiosaerneuerung (14.3 % in 4 Wochen). Dem Umbiegen der Kurve in der 1o. Lebenswoche entspricht im Einbauversuch als analoger Befund ein auffallender Rückgang der Knochenapposition, so daß hier tatsächlich ein gewisser "Wachstumsknick" der Epiphyse angenommen werden kann.

Betrachtet über die ganze Versuchsdauer bietet auch die bestrahlte Epiphyse keinen wesentlich anderen Verlauf. Ein unerwarteter Vorsprung in der Spongiosaerneuerung stellt sich jedoch 1 Woche p.irr. dar, besonders deutlich in der Tibia mit 25 % gegenüber 17 % der Kontrollseite. Dieser Vorsprung erklärt sich bei mikroskopischer Betrachtung aus einem deutlichen Mehrzuwachs von neuem Knochen, der wegen einer gleichzeitigen - nur in diesem Intervall beobachteten - Vermehrung des alten Knochens in den Zahlenwerten nicht einmal voll zum Ausdruck kommt. Im weiteren Verlauf bildet sich dieser Seitenunterschied wieder zurück. Dies bedeutet, daß nach der vorübergehenden Stimulierung im Lauf der 1. Woche p.irr. die Knochenneubildung offenbar wieder auf normales Maß reduziert wird, zunächst aber noch keiner Suppression durch die Bestrahlung unterliegt. Erst nach der 6. Woche p.irr. nimmt diese Entwicklung eine rasche Wendung. So konnte für die Zeit zwischen der 5. und 9. Woche p.irr (Versuch C) kein echter Wert für den Spongiosaumbau mehr bestimmt werden, da die Anbaugebiete dann stark eingeschränkt sind und ungleichmäßig über die Epiphyse

verteilt erscheinen. Dieser ziemlich unvermittelte Abbruch der Knochenneubildung fällt zeitlich zusammen mit dem Untergang des Epiphysenmarks und zeigt damit die gleiche Beziehung zwischen Markaplasie und endgültigem Erlöschen der osteoblastischen Tätigkeit, wie sie bereits für die Diaphyse festgestellt werden konnte. Während sich hier histologische Veränderungen eindeutig zuordnen lassen, bleibt die Genese der vorübergehenden Stimulierung des Knochenanbaus vorerst unklar.

Der absolut gesehen geringe Effekt eines transitorisch gesteigerten Ca-Einbaus in die bestrahlte Epiphyse taucht in den früher besprochenen Aktivitätsmessungen an Knochenasche verständlicherweise nicht auf. Da Epiphyse und Metaphyse dabei üblicherweise zusammen aufgearbeitet und untersucht werden, verschwindet er zwangsläufig hinter der wesentlich umfangreicheren Regression des Ca-Einbaus in der bestrahlten Metaphyse.
Hingegen kann die Rejuvenation der Epiphysenspongiosa quantitativen Ergebnissen gegenübergestellt werden, die v. Hevesy e.a. (35) bereits 1940, in einer der ersten tracer-Untersuchungen an Knochenmineral überhaupt, gewonnen haben. Unter Konstanthaltung der Serumaktivität durch kontinuierliche Zufuhr von ^{32}P wurde in der Kaninchenepiphyse die Erneuerung des Apatitphosphats verfolgt, die beispielsweise nach 9 Tagen 11.2 % und nach 50 Tagen 20 % erreicht. Obwohl damit genaugenommen nicht die Rejuvenation der Knochenstruktur, sondern die Erneuerung des Knochenminerals erfaßt wird, der sich noch verschiedene Austausch- und Rekristallisationsvorgänge überlagern, sind die Ergebnisse doch erstaunlich gut vergleichbar. Dies darf zumindest als Hinweis gewertet werden, daß auch in der Epiphyse dem Strukturumbau übergeordnete Bedeutung für den Mineralumsatz zukommt.

ANHANG: MIKROTECHNISCHE UND AUTORADIOGRAPHISCHE METHODIK

Die technischen Schwierigkeiten einer autoradiographischen Untersuchung des Knochenmineralstoffwechsels liegen zum Teil in der Notwendigkeit, das Gewebe in unentkalktem Zustand aufzuarbeiten. Während Knochenschliffe heute nur noch für bestimmte Zwecke Verwendung finden und für die Mikroautoradiographie von vornherein weniger geeignet sind, hat sich die Herstellung dünner Serienschnitte durch die Einführung der Acrylateinbettung wesentlich verbessern lassen. Auch mit dieser Technik ist es allerdings nicht ganz einfach, unversehrte Präparate von guter histologischer Qualität zu erhalten, vor allem wenn das Gewebe in ungünstiger Weise verändert ist, wie z.B. im vorliegenden Fall durch die Bestrahlung. Eine Methodik der Acrylateinbettung, die zu ganz hervorragenden morphologischen Ergebnissen führt, ist in den letzten Jahren von Burkhardt [1] ausgearbeitet worden (15,16). Das nachfolgend beschriebene Verfahren einschließlich der mikrotechnischen Aufarbeitung geht etwas andere Wege und bedient sich zum Teil auch einfacherer Mittel, hat sich aber für die Bedürfnisse der Autoradiographie als ausreichend erwiesen.

1. Präparation der Knochen und Vorbehandlung

Nach der Tötung der Tiere mit Äther wird die Bauchhöhle eröffnet und die Aorta abdominalis durch einen Kunststoffdrain mit 2o ml Kochsalzlösung oder Säugetyrode perfundiert. Diese Entblutungsmaßnahme scheint eine gewisse Verbesserung des Fixierungsbildes mit sich zu bringen. Femora, Tibiae und Patellae werden dann entnommen. Die langen Röhrenknochen werden auf einer kleinen Kreissäge mit einem glatten, gut geschliffenen Schneidrad (umgearbeiteter Scheibenfräser) an mehreren Stellen eröffnet, und zwar die knieseitigen Gelenkenden von Tibia und Femur durch zwei frontale Schnitte auf der Vorder- und Rückseite, Caput und Trochanteren des Femur sowie die Gelenkköpfe der Malleolengabel durch entsprechend kleinere Schnitte. Bei richtiger Führung parallel zur späteren Schnittebene des Knochens bleiben diese Eingriffe in den histologischen Präparaten unsichtbar. Zuletzt werden Tibia und Femur in Schaftmitte quergeteilt.

---

[1] Herrn Prof. Dr. R. Burkhardt sei an dieser Stelle für Anregungen und Diskussionsmöglichkeit herzlich gedankt.

Diese Eröffnung hat sich für die ausreichende Durchdringung des Knochens mit den Agentien der Vorbehandlung als unbedingt notwendig erwiesen; die Entfernung von überstehenden Teilen der Kondylen erleichtert zudem die Orientierung der Präparate bei der Einbettung. Während beim gewöhnlichen Sägen eine Beschädigung der Spongiosa unvermeidlich ist, erhält man mit diesem reinen Trennvorgang auffallend glatte und saubere Schnittränder. Es ist allerdings darauf zu achten, daß der Knochen beim Schneiden ständig mit einer geeigneten Flüssigkeit wie z.B. Kochsalzlösung oder 7o %igem Alkohol beträufelt wird, da sonst ausgedehnte Hitzekoagulierungen des Knochenmarks entstehen.
Im weiteren können alle Knochenpräparate eines Tieres gesammelt behandelt werden, da sich bestrahlte und unbestrahlte Seite makroskopisch wie mikroskopisch leicht unterscheiden lassen. Zur Fixierung werden sie zunächst in 99 %igen Äthyalalkohol gebracht und von dort schrittweise in reines monomeres Acrylat überführt. Dabei werden folgende Stufen durchlaufen:

99 % Alkohol	1 Std.
99 % Alkohol 99 % Alkohol	16 Std.
loo % Alkohol (über Molekularsieb entwässert)	3 Std.
loo % Alkohol/Acrylat (1:1) mind.	24 Std.
Acrylat I	2 Tage
Acrylat II	2 Tage

Die letzten beiden Schritte können etwas abgekürzt, aber ohne Schaden auch überzogen werden.
In allen Flüssigkeiten, also bereits vom 99 %igen Alkohol an, sollen die Knochenstücke zur Unterstützung der Diffusion durch Magnetrührer oder Schüttelmaschine kräftig bewegt werden. Vor allem die Fixierung verläuft ohne diese Maßnahme sehr ungleichmäßig. Mechanische Beschädigung des Knochenmarks kommt dabei nicht vor, bei zu lebhafter Bewegung zerfasert lediglich die dem Knochen anhaftende Muskulatur. Bei Verwendung eines Magnetrührers ist zu beachten, daß über die Standplatte nicht eine Erwärmung der Lösung erfolgt, bzw. daß die übertragene Wärme wieder abgeführt wird, z.B. durch eine in die Lösung eintauchende wassergekühlte Kupferschlange.

Der als Fixierungsmittel verwendete Alkohol führt bekanntlich nicht zu optimalen histologischen Ergebnissen, da seine Wirkung nur in einer Dehydrierung besteht. Dafür entzieht er aber dem Knochen praktisch kein ^{45}Ca, während die gebräuchlichen Fixantien, vor allem die säurehaltigen, bei längerer Verweildauer ausnahmslos eine decalcifizierende Wirkung entfalten und sich selbst in gepuffertem Formol (pH 6.8) nach 48-stündiger Fixierung noch 3-5 % der Gesamtaktivität nachweisen lassen. Aus diesem Grund wurden die histologischen Nachteile von Alkohol in Kauf genommen; sie bestehen hauptsächlich in einer starken Schrumpfung, worauf wahrscheinlich die in einigen Abbildungen sichtbaren Hohlräume im Knochenmark zurückgehen, die im Block noch mit Polyacrylat gefüllt sind und daher kein eigentliches Einbettungsartefakt darstellen. Auch gewisse Fixierungsfiguren der Knochemarkszellen an Knochenrändern und in kleinen Hohlräumen des Marks sind für die Alkoholfixierung typisch.
Der verwendete monomere Methylester der Methacrylsäure ist vom Hersteller üblicherweise mit o.o5 % Hydrochinon versetzt, das als Reduktionsmittel die spontane Polymerisation verhindert. Dieser Inhibitor wird durch eine Vakuumdestillation mit Stickstoffdurchfluß entfernt, was praktischer als das früher übliche Ausschütteln mit Kalilauge ist (15). Auch durch die Vorbehandlung verunreinigtes Acrylat läßt sich auf diesem Weg wieder reinigen. Wegen der Gefahr unerwünschter spontaner Polymerisation muß das entstabilisierte Acrylat im Kühlschrank aufbewahrt werden.

2. Die Einbettung erfolgt in einem Gemisch, das außer monomerem Acrylat einen Starter, Dibenzoylperoxid, sowie einen Weichmacher, Dibutylphthalat enthält, durch dessen Konzentration der Härtegrad der Blöcke variiert werden kann. Die Bestandteile werden in folgendem empirisch ermittelten Verhältnis verwendet:

loo ml Acrylat
3o ml Dibutylphthalat
2 g Dibenzoylperoxid (getrocknet).

Zur Herstellung gibt man Starter und Weichmacher in der erforderlichen Menge in einen graduierten Zylinder mit Rundboden und Schliff, der an die Destillationsapparatur angeschlossen wird. In diese Vorlage wird dann so lange Acrylat überdestilliert, bis

das errechnete Gesamtvolumen erreicht ist; eine Volumenkontraktion tritt bei der Vermischung von Acrylat und Phthalat nicht ein. Am Beginn der Vakuumdestillation kommt es zu einer anhaltenden Entwicklung von Gasblasen an der Phasengrenze Starter/Weichmacher, die das Ausgasen des Phthalats anzeigt. Hauptsächlich wegen dieses erwünschten Effekts ist die Herstellung im geschlossenen System gewählt worden; aus der gleichen Überlegung heraus wird auch das fertige Einbettungsgemisch so weit wie möglich unter Luftabschluß weiterverarbeitet.
Der Erfolg der Einbettung ist allerdings sehr unbefriedigend, wenn man die Knochen unmittelbar aus dem Acrylat in dieses Gemisch überträgt und sofort anschließend die Polymerisation einleitet. Die Acrylateinbettung biologischer Proben ist mit einigen grundsätzlichen Schwierigkeiten verbunden, die auch bei Verwendung anderer Starter- und Weichmacheragentien auftreten (15). Bekannt ist vor allem die hartnäckige Freisetzung von Gasblasen, die sich im Laufe der Polymerisation an der Oberfläche und im Inneren der Gewebesprobe bilden und bei der Aushärtung mit eingeschlossen werden. Wahrscheinlich sind Gase, deren Löslichkeit mit zunehmender Vernetzung des Acrylats zurückgeht, das Substrat dieser Blasenbildung; andererseits wird sie erst durch das Einbringen einer Gewebsprobe mit ihren zahlreichen Phasengrenzen ausgelöst, da Leerproben unter sonst gleichen Bedingungen meist fehlerfrei aushärten. Eine sichere und für jede Versuchsanordnung wirksame Abhilfe ist bislang nicht bekannt.
Abgesehen von diesen Blasen, die im Schnitt als völlig leere Stellen erscheinen, können weitere Artefakte leicht bei ungenügender Gewebsdurchtränkung mit dem Einbettungsgemisch entstehen. Die Verweildauer des Gemisches darf in Anbetracht der stark behinderten Diffusion im Knocheninneren keinesfalls zu kurz bemessen werden. Bei unvollständigem Austausch gegen das Acrylat der Vorbehandlungsreihe treten im Knochenmark mangelhaft imprägnierte oder völlig uneingebettete trockene Stellen von unverhältnismäßig großer Ausdehnung auf.
Ein Verfahren, das gute und sicher reproduzierbare Ergebnisse liefert, konnte erst im Laufe der Versuche ausgearbeitet werden. Seine wesentlichen Merkmale sind:

a) Gründlicher Austausch des Acrylats (Stufe II) gegen das Einbettungsgemisch durch Einbetten der Knochenpräparate in evakuiertem Zustand.
b) Weitere Förderung der gleichmäßigen Gewebsdurchtränkung durch längere Verweildauer im Gemisch unter ständiger Bewegung.
c) Anpolymerisieren des Gemisches ebenfalls noch unter lebhafter Bewegung der Knochenpräparate.
d) Geeignete Anordnung der Gußgefäße, die eine Aushärtung der Blöcke von unten nach oben erlaubt.

Im einzelnen geht die Einbettung so vor sich:
Die Knochen werden dem Acrylat (Stufe II) entnommen. Nach kurzem Abtupfen auf Zellstoff werden sie in ein Evakuierungsgefäß, z.B. einen Saugerlenmeyerkolben gebracht, der durch einen durchbohrten Gummistopfen mit Scheidetrichter verschlossen wird. Für 5 Minuten werden die Präparate dem Vakuum einer Doppelschieberpumpe ausgesetzt (ca. 10^{-2} Torr), wobei sie an ihrer Oberfläche schon nach kurzer Zeit vollkommen austrocknen und sich grauweiß verfärben. Hierauf wird durch den Scheidetrichter das Gemisch auf die immer noch unter Vakuum stehenden Knochen zugegeben. Sie bleiben dann für 14 bis 18 Stunden bei Zimmertemperatur und unter ständiger Bewegung durch einen Magnetrührer im Einbettungsgemisch. Anschließend wird die Temperatur im Wasserbad auf 40 bis 45° erhöht, so daß die Polymerisation in Gang kommt und das Gemisch innerhalb einiger Stunden unter ständigem Rühren zähflüssig wird. Dieser Vorgang verläuft umso schneller, je kleiner das Luftvolumen im (gut zu verschließenden) Reaktionsgefäß ist. Wenn das Gemisch etwa die Viskosität von Glycerin erreicht hat, wird die Polymerisation durch Abkühlen auf Zimmertemperatur unterbrochen.

Die Knochenpräparate werden nun mit dem anpolymerisierten Gemisch einzeln auf die Gußgefäße verteilt; als solche haben sich zylindrische Glasfläschchen mit Schraubverschluß bewährt (Innendurchmesser 25 mm). Nach sorgfältiger Orientierung werden sie verschlossen und im Wasserbad bei 40° C inkubiert; die Blöcke härten dann innerhalb von 24 bis 36 Stunden aus.
Die Freisetzung von Glasblasen während des Polymerisationsvorganges läßt sich fast sicher vermeiden, wenn beim Verschließen der Gußgefäße dafür gesorgt wird, daß durch den Verschluß hindurch ein gewisser Gasaustausch erhalten bleibt. Am einfachsten geschieht dies, indem man den Schraubdeckel nur bis zum ersten

fühlbaren Widerstand anzieht, exakter und besser reproduzierbar ist ein Verschluß mit Gummistopfen und durchgesteckter Injektionskanüle. Dadurch wird erreicht, daß die Polymerisation am Boden der Probe beginnt und nach oben bis zu einer gewissen Höhe fortschreitet. So bildet sich im Laufe von 12 bis 18 Stunden zunächst basal ein mehrere Millimeter hoher, fester Zylinder, der den Knochen einschließt und gegen die darüberstehende, noch flüssige Phase abgesetzt ist. Die Demarkation ist auch von außen als optische Grenze sichtbar. Erst zu diesem Zeitpunkt wird das Gefäß luftdicht verschlossen und dadurch die Aushärtung der gesamten Probe in weiteren 12 bis 24 Stunden ermöglicht.
Dieser besondere Ablauf beruht wahrscheinlich auf einer Sauerstoffwirkung: O_2 kann u.a. durch Bildung des reaktionsträgen Radikals $RO_2^{\cdot}$ konkurrierend in die Kettenbildung eingreifen und die Polymerisation hemmen. Wenn der in der Probe gelöste Sauerstoff verbraucht ist, sinkt bei gedrosselter Nachdiffusion die O_2- Konzentration zunächst vor allem in den unteren Teilen der Probe ab, so daß die Polymerisation dort bevorzugt in Gang kommt. Die progrediente Aushärtung von unten nach oben fördert wiederum das Abdiffundieren von Stickstoff, der im monomeren Acrylat in großer Menge gelöst ist, mit steigender Vernetzung aber freigesetzt wird und dabei unter Umständen zur Blasenbildung führt.

3. Herstellung der Schnitte

Zur Zeit des Versuchsbeginns war kein einigermaßen handliches Mikrotom auf dem Markt, das den hohen Anforderungen an Stabilität genügt hätte. Es wurde daher versucht, ein von vorneherein möglichst geeignetes Gerät, das Mikrotom 1120 (Typ Minot) von Jung, durch Umbau zu adaptieren. Notwendig war hierzu die Neukonstruktion des Objekthalters, der in seiner serienmäßigen Ausführung ein außerordentlich schwingungsanfälliges Kugelgelenk enthält, und der Ersatz des Messerhalters. Der neu entwickelte Objekthalter ist aus einem kompakten Werkstück aus Messing gefertigt, an dem zum Einspannen der Blöcke eine Klaue abgeschraubt werden kann (Abb. 34). Der neue Messerhalter, der vor allem die freie Messerlänge reduzieren sollte, besteht aus einem stabilen, schräggestellten Stahlbock, der mit zwei kräftigen Schrauben im

Schlitz der Grundplatte verankert ist. Beim Zusammenbau wird zunächst ein winkelförmiger, dem Profil der d-Messer angepaßter Messerträger in den Stahlbock eingeführt und in diesen Support dann das Messer bis zur gewünschten Stelle eingeschoben. 6 Imbusschrauben, die in der Voderwand des Stahlbocks halbkreisförmig angeordnet sind, greifen am Messerträger in eine Nut mit gehärteter Einlage und verspannen Messerträger und Messer im Messerbock. Durch eine rechteckige Aussparung in der Rückwand des Stahlbocks, wie sie für die Vertikalbewegung des Objekthalters notwendig ist, wird die freie Messerlänge auf 3o mm festgelegt. Vor dem Messer bilden halbkreisförmige Ausnehmungen im Messerträger und in der Vorderwand des Messerbocks ein Arbeitsfenster, das nach vorne noch durch einen Steg abgeschlossen ist und somit bis zur Höhe der Messerfacette mit Wasser gefüllt werden kann. Die notwendige Abdichtung dieser Schnittwanne besorgt je eine Nut mit eingelegtem Dichtungsgummi in der Rückseite des Messerträgers und in der Vorderwand des Stahlbocks. Durch die Neigung des ganzen Messerhalters ist ein als günstig ermittelter Messeranstellwinkel von 17° vorgegeben, der durch Beilagen unter den Stahlbock aber nötigenfalls verändert werden kann.
Der Messerbock weist auf der rechten Seite eine Überhöhung auf, die ursprünglich für das Schneiden mit schräggestelltem Messer bis zu einem Neigungswinkel von 45° vorgesehen war. Der Messersupport kann hierzu um eine Achse in Höhe der Messerschneide gekippt werden, geführt durch den Eingriff der 6 Schraubenenden in die Nut mit gehärteter Einlage. In der Praxis wird der Vorteil, der beim Schneiden mit schräggestelltem Messer gegenüber der reinen Hobelbewegung mit horizontalem Messer zweifelsohne besteht, durch die relativ große Rauhigkeit von Schliff und Oberfläche der normalen d-Messer jedoch mehr als ausgeglichen. Aus diesem Grunde wurde ausschließlich mit horizontal eingespanntem Messer gearbeitet.
Beim Schneiden wird zunächst sowohl die Messerfacette wie die Oberfläche des Blocks mit Wasser benetzt. Während die rechte Hand den Mikrotomantrieb betätigt, führt die linke Hand den Schnitt mit einem Pinsel über die Messerfacette auf die Wasseroberfläche der Schnittwanne und sorgt dafür, daß er dabei stets ausgebreitet bleibt. Er kann dann ohne Mühe von der Wasseroberfläche mit einem

sauberen Objektträger aufgefischt und zur weiteren Streckung für 1 - 2 Minuten in ein Wasserbad von ca. 5o° gebracht werden, wo er sich meist infolge der großen Wärmeausdehnung des Acrylats mehr oder weniger stark wellt. Nach dem Aufziehen wird er daher mit einem Streifen Polyäthylenfolie bedeckt und unter Vermeidung von Falten und Verwerfungen mit dem Finger sorgfältig glattgestrichen. Jeweils 3 oder 4 mit Folie abgedeckter Objektträger werden dann übereinandergesetzt und zum Trocknen in eine Preßvorrichtung aus Plexiglas eingespannt.

Zum Aufziehen der Schnitte werden nach einer Empfehlung der Firma Kodak AG. die sorgfältig entfetteten Objektträger mit 1 %iger Gelatinelösung unter Zusatz von o.1 % Chromalaun und einigen Phenolkristallen präpariert. Der Erfolg ist vor allem bei den nicht autoradiographierten, für verschiedene Färbungen herangezogenen Knochenschnitten keineswegs immer gut, ein wirklich sicheres Klebemittel jedoch bisher nicht bekannt.

Der günstigste Bereich beim Schneiden liegt etwa zwischen 4 und lo µ; es empfiehlt sich, gelegentlich die Konstanz der Schnittdicke auf der Analysenwaage zu kontrollieren, wobei aufeinanderfolgende Schnitte nach Trocknung praktisch gleich schwer sein müssen. Während für die Autoradiographie ausschließlich 5 µ-Schnitte hergestellt wurden, gelingen serienmäßige 3 µ-Schnitte manchmal bei den Knochen jüngerer Tiere (Körpergewicht unter 3oo g), allerdings nur von den Präparaten der unbestrahlten Seite. Die Knochen der bestrahlten Seite machen unabhängig von der Schnittdicke außerordentliche Schwierigkeiten, wenn die Strahlenschäden nach der 4. Woche p.irr. voll ausgebildet sind. Die kritische Zone liegt dabei unmittelbar unter der Epiphysenfuge, wo die normalerweise vorhandene zierliche Knorpel- und Knochenspongiosa durch ein brüchiges kalkdichtes Gewebe ersetzt wird, das beim Schneiden fast unvermeidlich herausbricht. Als wirksame Abhilfe wird diese Knochenzone auf der Blockoberfläche mit o.7 %igem Kollodium bestrichen, das nach dem Antrocknen dem Schnitt einen elastischen Zusammenhalt gibt, ohne daß das Acrylat durch die kurze Einwirkung der Äther-Alkohollösung bereits angelöst wird. Gegenüber der von verschiedenen Seiten empfohlenen Tesafilmmethode hat dieses Verfahren den großen Vorteil, daß die Schnitte ganz normal aufgezogen und weiterbehandelt werden können.

4. Autoradiographie

In Vorversuchen zur Autoradiographie wurden sowohl flüssige Emulsionen von Ilford und Kodak wie der AR. 1o Stripping Film getestet. Bei flüssigen Emulsionen war es wegen der stets vorhandenen Unebenheiten im Knochenschnitt kaum möglich, die Schicht in gleichmäßiger Dicke aufzubringen. Stripping Film wurde daher trotz einiger Schwierigkeiten, die er in der Nachbehandlung bietet, vorgezogen.

Der Autoradiographie geht ebenso wie auch allen Färbungen eine Entacrylierung des Schnitts voraus. Für 5 µ-Schnitte genügt das Einstellen in Methylglykolacetat für 3 x 1o Min. und dann in 99 %igen Alkohol für 2 x 5 Min.. Die Präparate werden anschliessend an der Luft staubgeschützt getrocknet und können dann für die Autoradiographie verwendet werden. Zur Applikation des Films empfiehlt sich ein bequemes und sicheres Verfahren, bei dem der Film durch verschiedene Alkoholbäder zum Strippen konditioniert wird [1]: Die Filmplatte wird zunächst für 6 Min. in 7o %igen Alkohol eingelegt, dann möglichst rasch mit Hilfe einer Schablone zugeschnitten und nochmals für 6 Min. in 99 %igen Alkohol gebracht. Danach können die einzelnen Filmstücke sehr leicht abgezogen und wie üblich auf H_2O gestreckt werden. Nach unseren Erfahrungen ist die Verwendung von methyläthylketon-vergälltem Alkohol ohne weiteres möglich.

Die mit Film bedeckten Präparate kommen zur Trocknung in einen lichtdichten Holzkasten, durch den der Luftstrom eines Staubsaugergebläses geleitet wird. Bei Betrieb mit Unterspannung (6o - 1oo V) über einen Regeltransformator gibt das Gebläse einen gut regulierbaren und kühlen Luftstrom ab. Im Inneren der Holzbox sind der Lufteinlaß- und Auslaßöffnung jeweils einige Blenden zur Lichtabsorption vorgeschaltet, die gleichzeitig auch als Abweisblenden für den Luftstrom wirken. Die Trocknung nimmt etwa 3 Stunden in Anspruch, doch kann in dieser Zeit die Dunkelkammer ohne Benutzung einer Lichtschleuse verlassen werden. Die Exposition erfolgt über $CaCl_2$ in einer lichtdichten Blechkammer bei 4° C. Nach Ablauf der Expositionszeit, die durchschnittlich

---

1) Persönliche Mitteilung Dr. Dörmer, Inst. f. Hämatologie der GSF, München, Landwehrstraße

2 - 3 Wochen beträgt, werden die Autoradiogramme nach folgendem Schema bei 19° C entwickelt: 1o Min. D 19b-Developer (Kodak), 1/2 Min. Wässern, 5 Min. Unifix; anschließend 3o Min. Wässern in einem thermostatisierten System mit leichtem Wasserdurchlauf bei 18° C, zuletzt Eintauchen der Schnitte in destilliertes Wasser und Trocknen über $CaCl_2$ im Exsikkator. Die Präparate können dann entweder sofort gefärbt oder auch für die spätere Verwendung aufbewahrt werden. Mit einer Entwicklungsdauer von 1o Min., die deutlich etwas über den sonst für Stripping Film üblichen Werten liegt, wurde absichtlich eine Kornvergröberung angestrebt, die für die Beobachtung großräumiger Verteilungsmuster und vor allem für die Mikrophotographie bei relativ schwachen Vergrößerungen erwünscht ist. Sie hat keinen nachteiligen Einfluß auf die geometrische Auflösung der Autoradiogramme, da die mittlere Reichweite der ß-Teilchen von ^{45}Ca in der Emulsion um mehr als eine Größenordnung über dem Korndurchmesser liegt.

Aus Versuchsgründen läßt sich der Zeitabstand zwischen Markierung und Expositionsbeginn nicht bei allen Tieren konstant halten. Damit der autoradiographische Effekt trotzdem von Tier zu Tier vergleichbar bleibt, muß der unterschiedliche Aktivitätszerfall durch die Expositionszeit wieder ausgeglichen werden (Halbwertszeit von ^{45}Ca 168 Tage). Dabei kann es sich nur um eine Annäherung handeln, die bei längeren Expositionszeiten durch die Schwächung des latenten Bildes (latent image fading) in nicht genau kontrollierbarer Weise beeinträchtigt wird. Für den praktischen Zweck hat sich aber trotzdem die Einführung eines Leitwerts bewährt, der das Produkt aus der Expositionszeit (in Tagen) und der auf Expositionsmitte korrigierten Restaktivität (^{45}Ca/3oo g Körpergewicht) darstellt. Für die proximale Tibia und den distalenFemur, also die Epimetaphysen mit relativ hoher spezifischer Aktivität, wurde $L_1 = o.9 \cdot 1o^{-3}$ gewählt, für die weniger aktiven restlichen Knochenteile $L_2 = 1.1 \cdot 1o^{-3}$. Diese Werte wurden auch bei den Tieren der Gruppe B und C eingehalten.

Die Färbung der Autoradiogramme beginnt mit der Entkalkung des Knochenschnitts, die z.B. durch mehrstündiges Einstellen in 5 %ige Ammoniumalaunlösung vorgenommen werden kann. Interessanterweise hat auch beim bereits eingebetteten Schnitt die Wahl des

Entkalkungsmittels noch einen deutlichen Einfluß auf das färberische Ergebnis. So färben sich die Zellkerne nach EDTA ausgezeichnet an, während Knorpelreste und andere basophile Knochenbestandteile, wie z.B. Kittlinien, die für die Erkennung der Knochenstruktur wichtig sind, sich dann kaum mehr darstellen lassen. Säuren scheiden als Entkalkungsmittel aus, da sie für den Film nicht verträglich sind.
Auch durch die Wahl des Hämalauns, mit dem ausschließlich gefärbt wurde, kann das histologische Bild in der einen oder anderen Richtung mehr betont werden. Die schärfste Kernfärbung liefert das saure Hämalaun nach Mayer, während saures Hämalaun nach Ehrlich Kittlinien, hyalinen und verkalkten Knorpel besser hervorhebt, gleichzeitig aber auch den Film sehr stark tingiert. Das beste Ergebnis wurde schließlich durch eine Sukzedanfärbung mit beiden Hämalaunen und anschließende Entfärbung des Film mit NH_4-Alaunlösung erreicht. Für die Reihenfolge der Hämalaune sind dabei folgende Faktoren von Bedeutung: E.Häm. wird durch die nachfolgende Behandlung mit M.Häm. so gut wie völlig wegdifferenziert, während umgekehrt der Färbeeffekt von M.Häm. durch E.Häm. nicht beeinträchtigt wird. Andererseits zieht M.Häm. aus unbekannten Gründen besser auf, wenn mit E.Häm. vorgefärbt wurde. Als günstigste Reihenfolge empfiehlt sich daher die Sequenz E.Häm. - M.Häm. - E.Häm.. Um schließlich vor dem Bläuen die störende Mitanfärbung des Films zu beseitigen, wird in 5 %iger NH_4-Alaunlösung so lange differenziert, bis der Film genügend aufgehellt ist, ohne daß sich der Schnitt bereits entfärbt.
Leider wird der Färbevorgang durch einen Umstand sehr erschwert, der für Stripping Film typisch ist und durch die mäßig haftenden Knochenschnitte noch gefördert wird. In allen wäßrigen Lösungen kommt es nämlich sehr leicht zu umschriebenen Abhebungen des Films vom Schnitt, oder auch von Film und Schnitt zusammen von der Unterlage und damit in jedem Fall zu einer quaddelartigen Ansammlung von Flüssigkeit. Der Film verwirft sich dann häufig und kann durch Dehydrierung allein nicht mehr in seine ursprüngliche Form zurückgebracht werden. Außerdem ist auch die Diffusionsbehinderung durch den Stripping Film so groß, daß die Präparate in der Färbereihe nicht mehr einfach weiterführt werden können; so gehen Retentionen von Hämalaun beim anschließenden Bläuen in wolkig gefärbte

Partien über, die beim Mikroskopieren und mehr noch beim Photographieren sehr stören. Eine wirksame Abhilfe war nur durch manuelles Eingreifen in folgender Form möglich: Auf den Film, der zu Beginn der Entkalkung auf angemessene Größe reduziert worden ist, wird ein Streifen P.Ä.-Folie aufgelegt; durch vorsichtiges Glattstreichen mit dem Finger wird die Flüssigkeit aus den Quaddeln ausgedrückt und am Rand der Folie aufgesaugt. Eventuell läßt man die Filmränder oder den ganzen Film anschließend antrocknen, was seine Festigkeit für den nächsten Schritt erhöht. Wie oft diese Maßnahmen im allgemeinen notwendig waren, kann aus dem Färbeschema ersehen werden.
Eine weitere Schwierigkeit, ebenfalls für Stripping Film typisch, entsteht häufig beim Eindecken der Präparate. Wenn das Eindeckmittel den Film nicht ausreichend durchdringt, trocknen größere Bereiche im Schnitt aus und werden durch den kapillaren Gasraum praktisch undurchsichtig. Der gleiche Effekt tritt nicht selten schon bei der Übertragung in Xylol auf, obwohl es merkwürdig erscheint, daß der Film auch hierfür undurchlässig sein soll. In der Literatur wird als Abhilfe empfohlen, das Präparat nach der Färbung in 2 %igen Polyvinylalkohol einzustellen und vor der Weiterbehandlung eintrocknen zu lassen (57). Dieser Schritt ist übernommen worden, allerdings mit geringem Erfolg. Als zusätzliche Maßnahme wird der Film nach dem 99 %igem Alkohol um den Knochen herum mit einer Präpariernadel vorsichtig angestochen.

Ausführung der Färbung:

1. Den trockenen Film in einigem Abstand vom Knochen mit einem scharfen Skalpell rechteckförmig einschneiden.
2. Einstellen in 5 %ige NH_4-Alaun-Lösung. Nach 1 Stunde überflüssige Filmstücke abziehen; Film wie oben beschrieben glattdrücken.
3. Nach weiteren 3 Stunden nochmals Film glattdrücken; Präparat staubgeschützt an der Luft eintrocknen lassen.
4. Ehrlich's Hämalaun 7 Min.; Film glattdrücken.
5. Bläuen 1o Min.; Film glattdrücken und antrocknen lassen. Die Präparate sehen jetzt meist ungleichmäßig überfärbt aus.
6. Mayer's Hämalaun 15 Min..
7. Ehrlich's Hämalaun 5 Min..

8. Differenzieren in NH_4-Alaun-Lösung, dabei öfters glattdrücken.
9. Bläuen 2o Min., Film glattdrücken.
1o. Einstellen in 2 %igen Polyvinylalkohol für 3o Min., Film glätten und antrocknen lassen.
11. Einstellen in 9o %igen Alkohol, bis der Schnitt völlig durchsichtig ist und keine Luft mehr enthält (mikroskopische Kontrolle).
12. 96 %, 99 %, 99 %iger Alkohol für jeweils 5 Min..
13. Film um den Knochen herum vorsichtig mit spitzer Präpariernadel anstechen, dabei häufig benetzen.
14. In mehreren Stunden durch Alkohol-Xylol-Gemische (2:1, 1:1, 1:2) in Xylol überführen.
15. Eindecken mit Caedax. Deckglas mit einer Wäscheklammer anpressen.
16. Im Brutschrank bei max. $5o^{\circ}$ über Nacht oder länger belassen. Eventuelle Austrocknungen können damit häufig rückgängig gemacht werden. Da sich das Caedax in der Wärme verflüssigt, werden die Schnitte auch besser plan.

Das Mayer'sche Hämalaun wird in der von Romeis (58) angegebenen Form verwendet. Ehrlich'sches Hämalaun tingiert in der normalen Konzentration den Film zu stark und muß mit aqua dest. im Verhältnis 1:2.5 verdünnt werden.

5. Färbung der nicht zur Autoradiographie verwendeten Schnitte

Zur genaueren Darstellung der histologischen Veränderungen wurden die nicht autoradiographierten Knochenschnitte verschiedenen Färbungen unterworfen. Außer der H.E.- und Giemsa-Färbung war dies vor allem eine Mehrfachfärbung mittels Alcianblau und modifiziertem van Gieson, mit der sich einige der charakteristischen Strahlenschäden gleichzeitig erfassen lassen, so die Anhäufung von verkalktem Knorpel an der bestrahlten Epiphysenfuge und die Fibrosierung des Knochenmarks. Alcianblau ist spezifisch für saure Mucopolysaccharide und damit für den verkalkten Knorpel, der sich in der bestrahlten Knorpelfuge als leuchtend blaugrünes Band zwischen der abschließenden Knochenleiste (intensiv rot) und dem hyalinen Knorpel (fast ungefärbt) heraushebt, während er bei allen anderen Färbungen sehr leicht übersehen werden kann. Das bei van Gieson

normalerweise verwendete Eisenhämatoxylin nach Weigert ergab keine sonderlich gute Kerndarstellung - Acrylatschnitte verhalten sich oft anders als paraffineingebettetes Material - und wurde durch Mayer's Hämalaun ersetzt. Von der Alaunentkalkung konnte in diesem Fall abgegangen werden, weil die Kittlinien usw. sich unter der Einwirkung der Pikrinsäure ohnehin wieder entfärben.

Ausführung:

1. Entacrylieren und absteigende Alkoholreihe.
2. Entkalken in 1o %igem EDTA für 45 Min.; gut abspülen in H_2O.
3. Alcianblau 1o Min., in H_2O abspülen und eintrocknen lassen. (1 g Alcianblau in 5o ml H_2O lösen und 5o ml 1 %ige Essigsäure hinzufügen).
4. Mayer's Hämalaun 15 Min.
5. Bläuen 1o Min.
6. Objektträger abtropfen lassen und um den Schnitt herum mit Papiertuch trocknen.
7. Pikrofuchsin-Thiazinrot auftropfen. (8.5 ml gesättigte Pikrinsäure, 1.5 ml 1 %iges Säurefuchsin, 1.25 ml 1 %iges Thiazinrot. Lösungen erst vor Gebrauch mischen).
8. Farbe 45 Sekunden auf den Schnitt einwirken lassen, dann rasch mit Papiertuch aufsaugen; Differenzieren in 96 %igem Alkohol.
9. Dehydrieren in 99 %igem Alkohol für 5 Min.
1o. Eintauchen in o.7 %iges Kollodium (Alkohol-Äther 1:1) für 1/2 Min., ablaufen und eintrocknen lassen.
11. Einstellen in Alkohol-Xylol 2:1, bis der Schnitt völlig durchsichtig ist; durch Alkohol-Xylol 1:2 in reines Xylol übertragen.
12. Eindecken mit Eukitt (Fa. Kindler, Freiburg). Gut pressen, da der Schnitt bei dieser Färbung meist sehr uneben wird.

Die Imprägnierung mit Kollodium bietet einen wirksamen Schutz gegen das Zerreißen des Knochengewebes, das sonst bei der Übertragung in Xylol fast unvermeidlich eintritt. Wichtig ist, daß das Kollodium völlig eintrocknet, und nicht, wie sonst üblich,

durch Einstellen in 8o %igen Alkohol "gehärtet" wird.
Bei der H.E.-Färbung erfüllt den gleichen Zweck ein Gelatineüberzug, da Kollodium nicht verwendbar ist (Eosin wird durch Alkohol extrahiert). Unmittelbar nach der Eosinfärbung wird der Schnitt kurz in H_2O abgespült, in o.8 %ige Gelatinelösung eingetaucht und dann getrocknet. Aufhellung und Differenzierung in 9o %igem Alkohol, aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, Eukitt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Wirkung einer lokalen Röntgenbestrahlung mit 2000 R auf den Knochenmineralstoffwechsel wurde im Kniegelenk der Ratte mikroautoradiographisch untersucht. Nach Bestrahlung des rechten Kniegelenks in der 8. Lebenswoche wurde der 48-Stunden-Einbau von ^{45}Ca bis zur 22. Woche p.irr., die Retention von unmittelbar nach Bestrahlung appliziertem ^{45}Ca bis zur 9. Woche p.irr. verfolgt. Von Tibia, Femur und Patella wurden nach Acrylateinbettung auf einem adaptierten Minot-Mikrotom unentkalkte 5 µ dicke Knochenschnitte hergestellt und mit Stripping Film autoradiographiert. Die unbestrahlte Seite diente als Kontrolle.

Der ^{45}Ca-Einbau zeigt auf der unbestrahlten Seite ein für den wachsenden Röhrenknochen charakteristisches autoradiographisches Muster. Als Orte mit hoher ^{45}Ca-Konzentration stellen sich vor allem der verkalkende Knorpel der Epiphysenfuge und die Knochenanbauzonen in der Metaphysenspongiosa sowie am Endost der Compacta dar; der präformierte Knochen nimmt ^{45}Ca in diffus verteilter Form auf, wobei junge Knochenelemente graduell bevorzugt sind. Die nach Bestrahlung im Verteilungsmuster eintretenden Veränderungen lassen sich weitgehend dem Untergang der Chondrocyten und Osteoblasten und dem Ausfall der von ihnen vermittelten Zelleistung parallel setzen. An der sterilisierten Knorpelfuge wird die präparatorische Verkalkung im Lauf der 1. Woche eingestellt und durch einen rudimentären Verkalkungsvorgang ersetzt. Die Knochenneubildung erlischt zuerst in der Zone der endochondralen Ossifikation (2. Woche), danach in der übrigen Metaphyse (3. Woche) und zuletzt in der Diaphyse und Epiphyse (6. Woche). Im gleichen Zeitraum nimmt auch die ^{45}Ca-Affinität des präformierten Knochens als Zeichen seiner Überalterung deutlich ab, so daß ein Minimum des Nuklideinbaus um die 6. Woche p.irr. erreicht wird. Die Einbaurate zeigt auch im weiteren Verlauf trotz ausgedehnter Neubildung von atypischem Knochengewebe und zunehmender histologischer Reparation keinen nennenswerten Anstieg, ein allmählicher Ausgleich der Seitenunterschiede erfolgt jedoch gegen Versuchsende durch die Altersinvolution der unbestrahlten Seite.

Als wichtiger Späteffekt ist die Entwicklung von Osteosarkomen in der bestrahlten Region zu erwähnen, die bei acht von insgesamt 12 Tieren nach dem 15. Monat p.irr. beobachtet wurde.

Die Retention von inkorporiertem ^{45}Ca wird wegen der Strukturgebundenheit des Ca-Umsatzes fast ausschließlich von den Wachstums- und Umbauvorgängen des Knochens bestimmt. Auf der unbestrahlten Seite erfolgt durch das Längenwachstum eine rasche Verschiebung und Elimination des Markierungsmusters im ursprünglichen Metaphysenbereich, der im Lauf von 4 bis 6 Wochen in ein neues Teilstück der Diaphyse umgewandelt wird. Auf der bestrahlten Seite kommt dieser Vorgang noch vor Ablauf der 1. Woche infolge eines irreversiblen Wachstumsstops zum Stillstand. Die markierte Spongiosa bleibt in einigem Abstand vor der Epiphysenfuge liegen und kann zudem wegen einer schwerwiegenden Resorptionsstörung nicht mehr abgebaut werden. Primär inkorporiertes ^{45}Ca wird dadurch in wesentlich höherem Umfang retiniert als im unbestrahlten Knochen.
Durch die mikrometrische Abstandsbestimmung der markierten Knorpelreste konnte im Retentionsversuch das Wachstum der einzelnen Epiphysenfugen quantitativ verfolgt werden. Die bestrahlten Knorpelfugen von Tibia und Femur leisten demnach im Lauf der 1. Woche p.irr. einen endgültigen Wachstumsbeitrag von rund 750 µ, während an den unbestrahlten Knorpelfugen zwischen der 8. und 17. Lebenswoche eine entscheidende altersbedingte Retardierung sichtbar wird. Als weitere Wachstumsleistung konnte durch ein planimetrisches Verfahren die Strukturerneuerung der Epiphysenspongiosa quantitativ bestimmt werden. Sie erreicht in den Femurepiphysen bis zur 6. Woche einen seitengleichen Wert von etwa 36 % und fällt erst danach in der bestrahlten Epiphyse stark ab. Im Lauf der 1. Woche p.irr. wird in der bestrahlten Epiphyse sogar eine deutliche Mehrbildung von neuem Knochen beobachtet, der im Einbauversuch eine vorübergehende Steigerung der Knochenapposition entspricht; der Mechanismus dieser Stimulierung ist noch unklar.
Im Zusammenhang mit den eigenen Befunden wird eine Reihe früherer Untersuchungen am lokal strahlengeschädigten Knochen diskutiert. Es handelt sich dabei vor allem um Stoffwechseluntersuchungen mit osteotropen Radionukliden, deren Ergebnisse anhand des autoradiographischen Verlaufs differenzierter als bisher gedeutet werden können.

LITERATURVERZEICHNIS

1. A m p r i n o, R. Autoradiographic Analysis of the Distribution of Labelled Calcium and Phosphorous. Experientia 8, (1952), 2o.

2. A r n o l d, J.S. Metabolism of bone as studied by radioautographicdistribution of calcium, plutonium and radium. Am. J. Physiol. 167, (1951), 765.

3. A r n o l d, J.S., W.S.S. J e e, K. J o h n s o n. Observations and quantitative radioautographic studies of Ca-45 deposited in vivo in forming Haversian systems and old bone of rabbit. Am. J. Anat. 99, (1956), 291.

4. B a r n h a r d, H.J., R.W. G e y e r. Effects of X-Radiation on Growing Bone. Radiology 78, (1962), 2o7.

5. B a r r, J.S., J.R. L i n g l e y, and E.A. Gall. The effect of roentgen irradiation on epiphyseal growth; experimental studies upon the albino rat. Am. J. Roentgenol. 49, (1943), 1o4.

6. B a s e r g a , R., H. L i s c o, and D. C a t e r. The delayed effects of external gamma-irradiation on the bones of rat. Am. J. Path. 1o, (1961), 455.

7. B a u e r, G.C.H., A. C a r l s s o n, and B. L i n d q u i s t. Metabolism and Homeostatic Function of Bone. In: Mineral Metabolism, C.L.C. C o m a r and F. B r o n n e r (ed.), chapter 14, pp. 6o9-676. Academic Press, New York 1961.

8. B e n s t e d, J.P.M. and V.D. C o u r t e n a y. Histological Changes in the Rat Bone after Varying Boses of X-Rays with Particular Reference to Bone Tumor Production. Brit. J. Radiol. 38, (1965), 261.

9. B i a n c h i, C. Radiol. e Fisica med. 4, (1937), 81. Zitiert nach A. L. M e i e r (51).

lo. B i s g a r d, J.D. and H.B. H u n t. Influence of X-Rays and Radium on Epiphyseal Growth of Long Bones. Radiology 26, (1936), 56.

11. B l a c k b u r n, J. and A.B. W e l l s. Radiation Damage of Growing Bone: The Effect of X-Ray Doses of loo - looo R on Mouse Tibia and Knee Joint. Brit. J. Radiol. 36, (1963), 5o5.

12. B l o o m, W. and F.C. Mc L e a n. Calcification and Ossification. Calcification in normal growing bone. Anat. Rec. 78, (194o), 333.

13. B o u r n e, G.A. The Biochemistry and Physiology of Bone. Academic Press Inc. Publishers, New York 1956.

14. B r e i t l i n g, G., G l o c k e r, R. und H. M o h r. Die Messung der Röntgendosis in Fett, Muskel, Knochen mit Hilfe von Leuchtstoffen verschiedener Zusammensetzung, Röfo 84, (1956), 561.

15. B u r k h a r d t, R. Präparative Voraussetzungen zur klinischen Histologie des menschlichen Knochenmarks. Blut 13, (1966), 337.

16. B u r k h a r d t, R. --- 2. Mitteilung. Blut 14, (1966), 3o.

17. C a t e r, D.B., B a s e r g a, R. and H. L i s c o. Radiographic appearances of bone lesions in rats exposed to local external irradiation from gamma-rays. Acta radiol. 54, (196o), 273.

18. C o h n, S.H. and J.K. G o n g. Effect of 2ooo roentgens local X-irradiation on metabolism and alkaline phosphatase activity of rat bone. Am. J. Physiol. 173, (1953), 115.

19. -------. Effect of local X-irradiation on the growth of rat bone. Growth 17, (1953), 7.

2o. C o m a r, C.L., L o t z, W.E., and G.A. B o y d. Autoradiographic Studies of Calcium, Phosphorus and Strontium Distribution in the Bones of the Growing Pig. Am.J. Anat. 9o, (1952), 113.

21. D a h l, B. De l'effet des rayons X sur les os longs en dévelopment et sur le formation de cal. Skrifter Norske Videnskaps-Akademi i Oslo; I. Mat.-Naturv. Klasse 1936, No. 1.

22. E n g f e l d t, B.A. and E n g s t r o m R.. Renewal of phosphate in bone minerals. II. Radioautographic studies of the renewal of phosphate in different structures of bone. Biochem. Biophys. Acta 8, (1952), 375.

23. F i n s t o n, R.A., W o o d a r d, H.Q. and L a u g h l i n, J.S.. Effects of External Irradiation on Mineral Metabolism in the Bone of Adult Dogs. Clin. Orthopaed. 46, (1966), 183.

24. F ö r s t e r l i n g, K. Über allgemeine und partielle Wachstumsstörungen nach kurz dauernden Röntgenbestrahlungen von Säugetieren. Archiv f. Klin. Chir. 2, (19o6), 5o5.

25. G a l l, E.A., L i n g l e y, J.R. and J.A. H i l c k e n. Comparative experimental studies of 2ookV and loookV roentgen rays. I. The biologic effects on the epiphysis of the albino rat. Am. J. Path. 16, (194o), 6o5.

26. - II. The biologic effect on the bone marrow of the albino rat. Am. J. Path. 16, (194o), 6o5.

27. G a u w e r k y, F. Studien über die Strahlenschädigung des wachsenden Knochens unter besonderer Berücksichtigung des Zeitfaktoreinflusses. Habilitationsschrift Hamburg 1956.

28. - Die Bedeutung biologischer Kompensationsvorgänge für das Ausmaß von Strahlenwirkungen. Strahlenther. 1o6, (1958), 227.

29. G ö s s n e r, W. Euratom-Jahresbericht 1965 des Institutes für Biologie der Gesellschaft für Strahlenforschung, Neuherberg bei München. EUR. 327o, d, 1967.

3o. - Persönliche Mitteilung.

31. G ü n s e l, E. Die Strahlenschäden am wachsenden Knochen. Strahlenther. 91, (1953), 595.

32. H e l d, F. Die Bedeutung der Strahlenqualität für die schädigende Wirkung ionisierender Strahlung auf die Tibia-Epiphysenfuge der Albinoratte. Radiobiol. Radiother. 2, (1961), 151.

33. H e l l e r, M. Bone. In: Histopathology of irradiation from external and internal sources, W. B l o o m (ed.), chapter 5, pp. 7o-161. McGraw Hill Book Co., New York 1948.

34. v. H e v e s y, G.C. Skeletal Metabolism. In: Radioactive Indicators, chapter 1o, pp. 4o9-444. Interscience Publ. Inc., New York 1948.

35. v. H e v e s y, G.C., H.B. L e v y, and O.H. R e b b e. Rate of Rejuvenation of the Skeleton. The Biochem. Journal 34, (194o), 532.

36. H i n k e l, C.L. Zitiert nach C.G. v. H e v e s y (34).

37. - The effect of roentgen ray upon the growing long bones of albino rat. I. Quantitative studies of the growth limitation following irradiation. Am. J. Roentgenol. 47, (1942), 439.

38. - II. Histopathological changes involving endochondral growth centers. Am. J. Roentgenol. 49, (1943), 321.

39. - The effect of irradiation upon the composition and vascularity of growing rat bones. Am. J. Roentgenol. 5o, (1943), 516.

4o. J e f f a y, H., and H.R. B a y n e. Bone resorption and Ca45-turnover in growing rats. Am. J. Physiol. 2oo, (1961), 335.

41. J o s t, G. Biologische Wirkung verschiedener Röntgendosen an den Epiphysenfugen jugendlicher Röhrenknochen im Tierexperiment. Arch. Orthop. Unfall-Chir. 49, (1957), 5o.

42. K e m b e r, N. F. Cell division in endochondral ossification. J. Bone Joint Surg. 42-B, (196o), 824.

43. K o l a r, J. and A. B a b i c k y. Untersuchungen zum Knochenkalziumstoffwechsel in der Epi- und Metaphyse nach lokaler Röntgenbestrahlung. Strahlenther. 1o9, (1959) 483.

44. - Die Ermittlung der Strahlenempfindlichkeit verschiedener Knochenwachstumszonen mit Hilfe des Ca 45-Stoffwechsels. Strahlenther. 114, (1961), 265.

45. - Die Untersuchungen zum Knochenkalziumstoffwechsel in der Epi- und Metaphyse nach lokaler Röntgenbestrahlung: Der Einbau von Ca 45. Strahlenther. 119, (1962), 236.

46. L é b l o n d, C.P., G.W. W i l k i n s o n, C.F. B é l a n g e r, and J. R o b i c h o n. Radioautographic visualization of bone formation in the rat. Am. J. Anat. 86, (195o), 289.

47. L i k i n s, R.C., R.D. S c o w, I. Z i p k i n, and A.C. S t e e v e. Deposition and retention of fluoride and radiocalcium in the growing rat. Am. J. Physiol. 197, (1959), 75.

48. M a r i n e l l i, L.D. and J.M. K e n n e y. Absorption of Radiophosphorus in Irradiated and Non-irradiated Mice. Am. J. Roentgenol. 37, (1941), 691.

49. M a r s h a l l, J.H., V.K. W h i t e, and J. C o h e n. Microscopic Metabolism of Calcium in Bone. Three-Dimensional Deposition of Ca 45 in Canine Osteons. Rad. Res. 1o, (1959), 197.

5o. M a t s u z a w a, H., K. H o s h i n o, T. I n a d a, and K. K a w a s h i m a. Energy distribution of electrons ejected from bone and lucite by 15o - 2oo kVp X-rays. Brit. J. Radiol. 38, (1965), 131.

51. M e i e r, A.L. Einwirkung der Radiumstrahlen auf den wachsenden menschlichen Knochen. Strahlenther. 84, (1951), 587.

52. N e u m a n, W.F. and M.W. N e u m a n. The Chemical Dynamics of Bone Mineral. The University of Chicago Press, Chicago 1958.

53. O w e n, M. Cell population kinetics of an osteogenic tissue; I. Communication. J. Cell. Biol. 19, (1963), 19.

54. O w e n, M. and S. M a c P h e r s o n. -; II. Communication.

55. P e r t h e s, G. Über den Einfluß der Röntgenstrahlen auf epitheliale Gewebe, insbesondere auf das Carcinom. Arch. Klin. Chir. 71, (19o3), 955.

56. R e i d y, J.A., J.R. L i n g l e y, E.A. G a l l, and J.S. B a r r. The Effect of Roentgen Irradiation on Epiphyseal Growth. J. Bone Joint Surg. 29, (1947), 853.

57. R o g e r s, A.W. Techniques of Autoradiography. Elsevier-Publishing Co., Amsterdam/London/New York 1967.

58. R o m e i s, B. Mikroskopische Technik, Oldenbourg, München 1948.

59. R o s e n t h a l, L. and J. M a r v i n. The Effect of Roentgen-Ray Quality on Bone Growth and Cortical Bone Damage. Am. J. Roentgenol. 77, (1957), 893.

6o. S a m s, A. Effect of X-Irradiation on the Circulatory System of the Hind Limb of the Mouse. Int. J. Rad. Biol. 7, (1963), 113.

61. - The Effect of 2ooo R of X-rays on the acid and alkaline phosphatase of mouse tibia. Int. J. Rad. Biol. 1o, (1966), 123.

62. - The Effect of 2ooo R of X-rays on the internal structure of the mouse tibia. Int. J. Rad. Biol. 11, (1966), 51.

63. S i n g e r, L. and W.D. A r m s t r o n g. Retention and turnover of Radiocalcium by the skeleton of large rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 76, (1951), 229.

64. S i n g e r, L., W.D. A r m s t r o n g, and M.L. P r e m e r. Skeletal Calcium Turnover in Non-Growing Rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 8o, (1952), 643.

65. S i s s o n s, H.A. Experimental study of the effect of local irradiation on bone growth. In: Report of the International Conference on Radiobiology 1955, (Cambridge).

66. T o m l i n, D.H., K.M. H e n r y, and S.K. K o n. Autoradiographic Study of Growth and Calcium Metabolism in the Long Bones of Rat. Brit. J. Nutrit. 7, (1953), 235.

67. T r u e t a, J. The Role of the Vessels in Osteogenesis. J. Bone Joint Surg. 45-B, (1963), 4o2.

68. T r u e t a, J. and J.D. M o r g a n. The Vascular Contribution to Osteogenesis. I. Studies by the Injection Method. J. Bone Joint Surg. 42-B, (196o), 97.

69. T r u e t a, J. and V.P. A m a t o. -, II. Communication. J. Bone Joint Surg. 42-B, (196o), 571.

7o. W i l s o n, C.W. The Uptake of ^{32}P by the Knee-Joint and Tibia of Six-Week-Old Mice and the Effect of X-Rays upon it. Brit. J. Radiol. 29, (1956), 86.

71. - The Effect of X-Rays on the Uptake of ^{32}P by the Knee-Joint and Tibia of Six-Week-Old Mice: Relation of Depression of Uptake to X-Ray Dose. Brit. J. Radiol. 29, (1956), 571.

72. W o o d a r d, H. Q. and F.W. S p i e r s. The Effect of X-Rays of Different Qualities on the Alkaline Phosphatase of Living Mouse Bone. I. Brit. J. Radiol. 26, (1953), 38.

73. W o o d a r d, H.Q. and E. L a u g h l i n. -, II. Effects of 22.5 MeV X-Rays. Rad. Res. 7, (1957), 26.

74. Y o u n g, R.W. Cell proliferation and specialization during endochondral osteogenesis in young rats. J. Cell. Biol. 14, (1962), 357.

75. Z o l l i n g e r, U. Knorpel und Knochen. In: Handbuch der Allgemeinen Pathologie, Band 1o, Teil 1, Strahlung und Wetter, Seite 141 - 153. Springer Berlin/Göttingen/Heidelberg 196o.

76. Z u p p i n g e r, A. und W. M i n d e r. Zur Beeinflussung des Kalziumstoffwechsels des Knochens durch ionisierende Strahlen. Strahlenther. 111, (196o), 244.

77. - Neue Versuche über den Strahleneinfluß auf die Kalziumaufnahme im Knochen. Strahlenther. 117, (1962), 63.

BILDTEIL

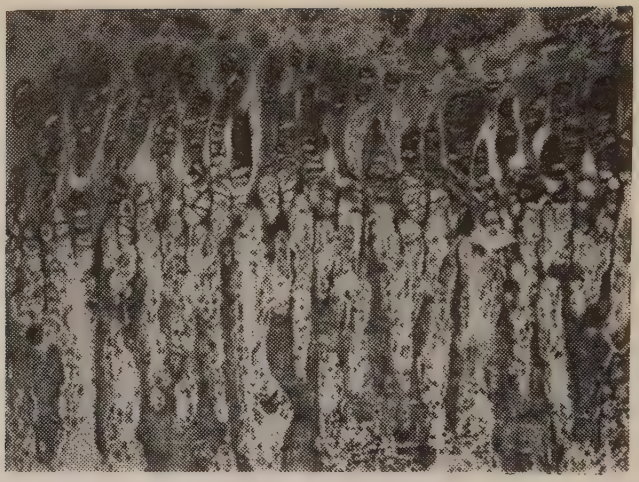


Abb. 1. Unbestrahlte Epiphysenfuge und Verknöcherungszone der proximalen Tibia, 1o Wochen alte Ratte. H.E., x 95.

Abb. 2. Ausschnitt aus der bestrahlten Tibiametaphyse, 2 Wochen nach 2ooo R. Beginnende Sklerosierung durch fibröse Knochenbildung bei weitgehend aplastischem Knochenmark. H.E., x 12o.

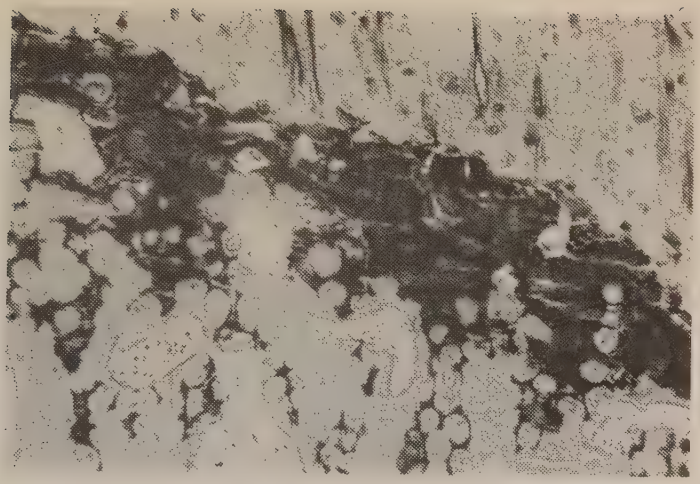


Abb. 3. Ausschnitt aus der bestrahlten Femurmetaphyse, 4 Wochen p.irr.. Die sterilisierte Knorpelfuge wird durch eine Platte von verkalktem, alcianpositivem Knorpelgewebe abgeschlossen (dunkle Zone). Deutliche Verplumpung der sekundären Spongiosa. Alcian-Pikrofuchsin, x 100.

Abb. 4. Ausschnitt aus der Femurmetaphyse, 6 Wochen p.irr.. Unter der Epiphysenfuge z.T. deutliche lakunäre Resorption. Kleine dystrophische Verkalkungsherde in den fibrotischen Markräumen und basophile Knochengewebsauflagerungen an allen Trabekeln. H.E., x 45.

Abb. 5. Normales Verteilungsmuster von ^{45}Ca in der proximalen Tibia, 48 Stunden nach Injektion des Nuklids (Versuch A). Als Schwärzungsmaxima stellen sich in diesem Übersichtsbild die Bereiche lebhafter Knochenneubildung dar, so die subchondrale Spongiosa der Metaphyse und das subendostale Anbaugebiet der lateralen Compacta (links). x 12.

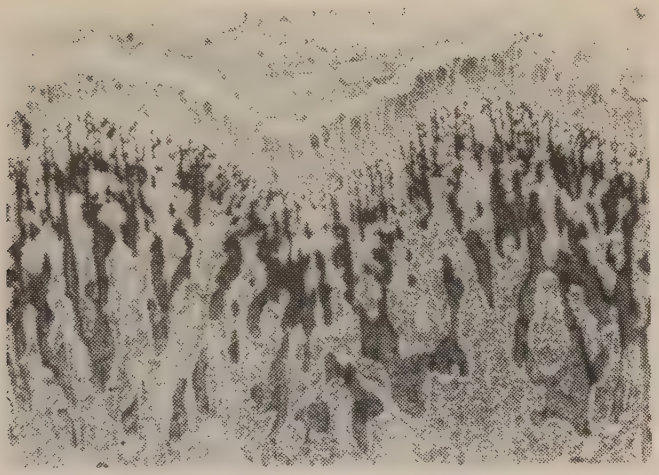


Abb. 6. ^{45}Ca-Einbau in der unbestrahlten Femurmetaphyse, 4h p.inj. (Versuch A). Unter der Epiphysenfuge zeigt sich die zierliche Spongiosa der verkalkten Knorpelreste, deren Markierung in die Schwärzungsmaxima der endochondralen Knochenneubildungszone übergeht. x 31.

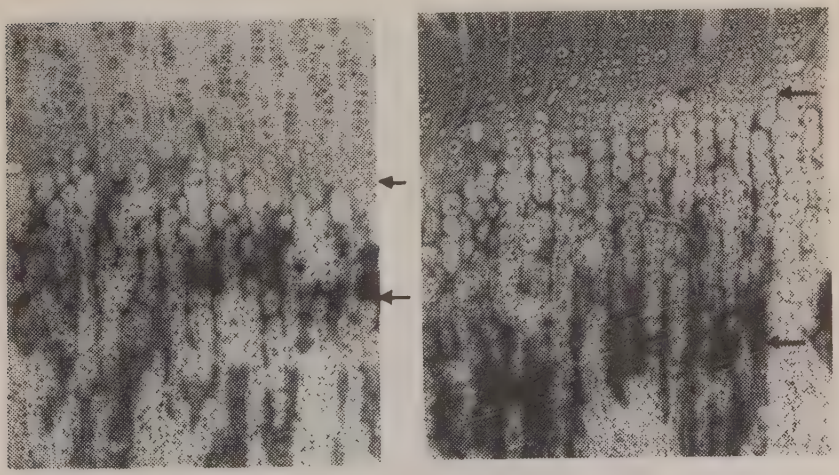


Abb. 7 und 8. Unbestrahlte Tibiametaphyse, 24 bzw. 48 Std. p.inj. (Versuch D und A). Infolge der Knochenproliferation hebt sich die Epiphysenfuge von den markierten Knorpelresten bereits deutlich ab. Der obere Pfeil bezeichnet die [illegible] Grenze der Knochenneubildung, der untere ihre mutmaßliche Lokalisation [illegible] der Epiphysenfuge. Abstand nach 24 Std. [illegible], nach 48 Std. [illegible] x 16.

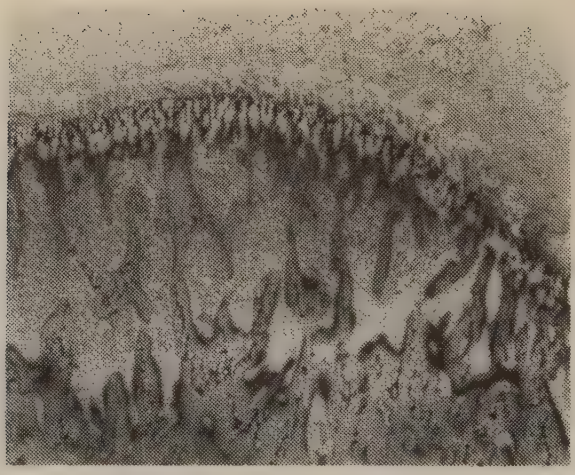


Abb. 9. Ausschnitt aus der unbestrahlten Tibiametaphyse einer 17 Wochen alten Ratte (Versuch A). Altersbedingte Einschränkung der endochondralen Ossifikation. Am unteren Bildrand tangential getroffener Schaftknochen mit subendostaler Knochenapposition. x 31.

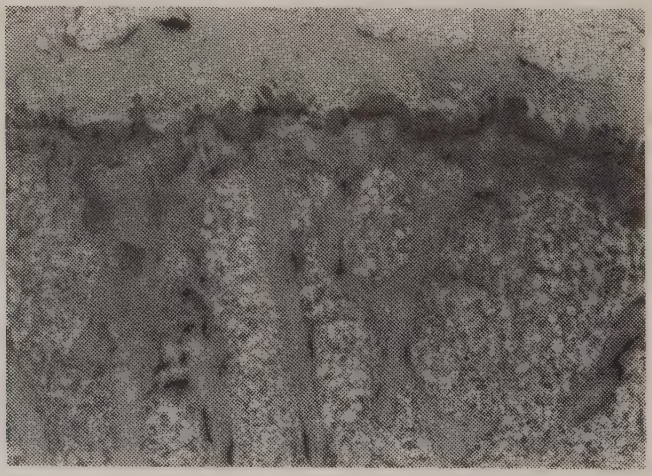


Abb. 1o. Unbestrahlte Tibiametaphyse einer 21 Monate alten Ratte (Versuch A). Trotz Einstellung der Knorpelproliferation noch ausgedehnte Knorpelverkalkung des hyalinen Knorpels, dargestellt durch einen durchgehenden Schwärzungssaum. x 31.

Abb. 11. ^{45}Ca-Einbau in der bestrahlten Tibia, 1 Woche p.irr. (Versuch A). Gegenüber der unbestrahlten Seite (siehe Abb. 5) lassen sich bereits einige Veränderungen im Verteilungsmuster erkennen, die vor allem die subchondrale Spongiosa betreffen. Hier und am Endost der lateralen Compacta (rechts) ist eine deutliche Abnahme der Aktivitätseinlagerung festzustellen. x 12.

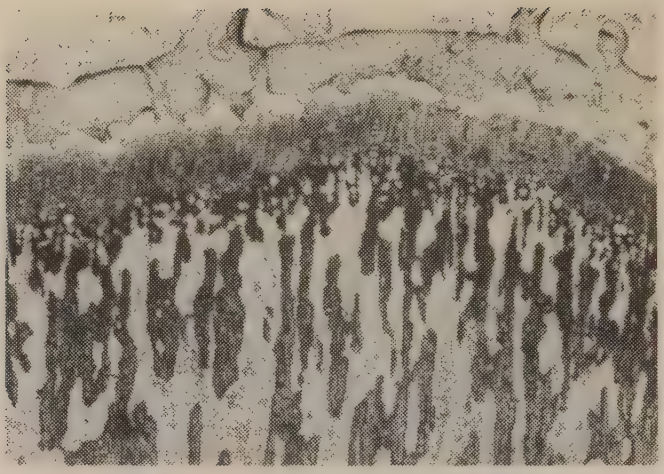


Abb. 12. Tibiametaphyse, 1 Woche nach 2ooo R (Versuch A). Die markierte Knorpelzone schließt unmittelbar an die Epiphysenfuge an. In der Metaphysenspongiosa deutlicher Rückgang des Knochenanbaus, nicht dagegen in den sichtbaren Teilen der Epiphyse. x 28.

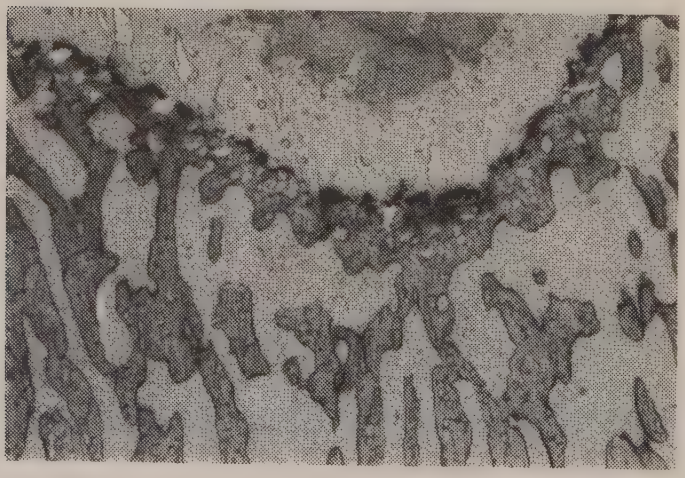


Abb. 13. Femurmetaphyse, 3 Wochen p.irr. (Ausschnitt aus Abb. 16). Der Schwärzungssaum markiert die Grenze zwischen hyalinem und verkalktem Knorpel. An den Knochenbälkchen der Metaphyse dunkle basophile Randsäume; die diffuse Aktivität der Trabekel ist nur noch in Knorpelnähe erhöht. x 41

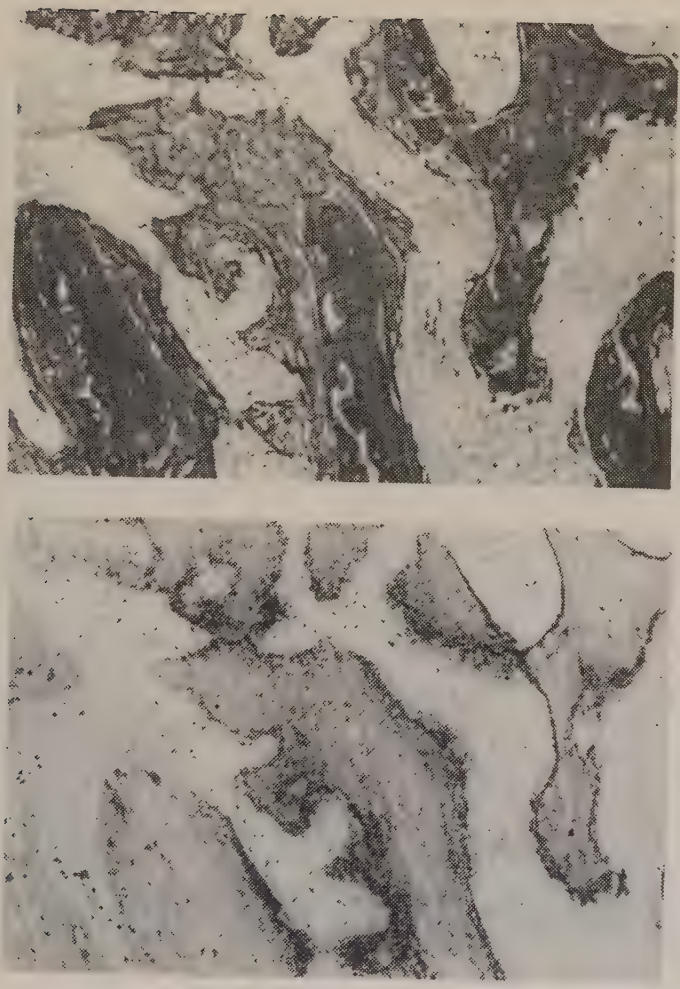


Abb. 14 und 15. Tibiametaphyse, 2 Wochen p.irr. (Versuch A). Pikrofuchsin-Präparat und zugehöriges Autoradiogramm. Ausgedehnte Neubildung von fibrösem Knochengewebe an den alten Trabekeln der distalen Metaphyse. Autoradiographisch zeichnen sich die neuen Knochenstrukturen durch unscharf begrenzte Schwärzungsmaxima oder lediglich durch erhöhte diffuse Markierung aus. x 11o.

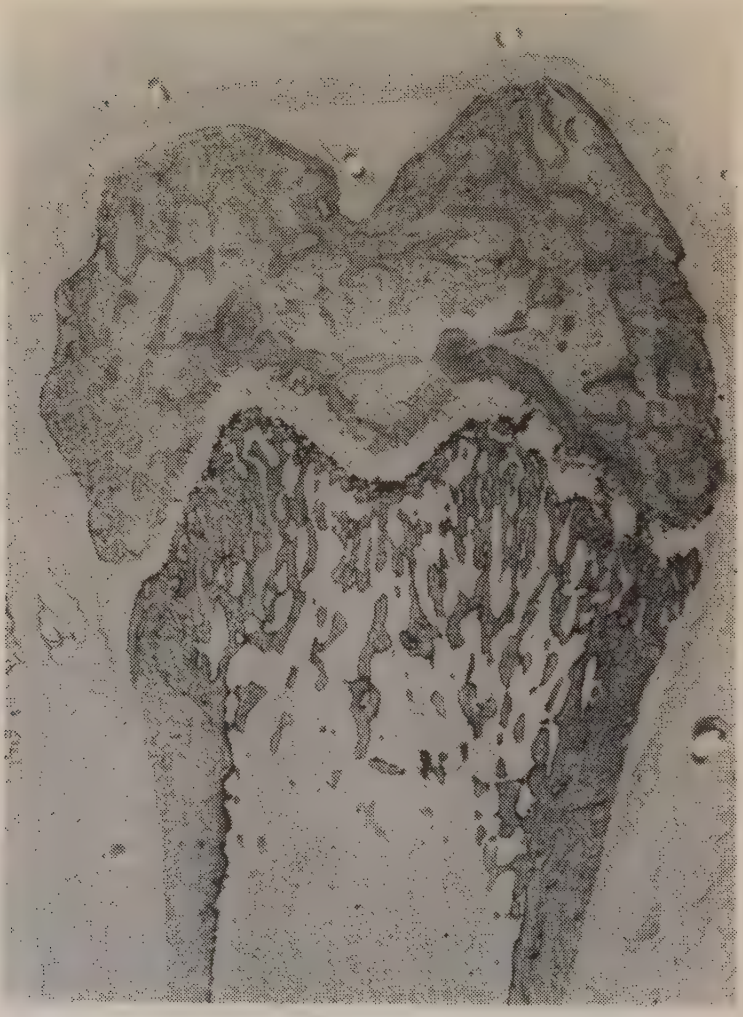


Abb. 16. ^{45}Ca-Einlagerung in den bestrahlten Femur, 3 Wochen p.irr. (Versuch A). Intensive Schwärzungen sind in diesem Stadium praktisch nur noch an der Epiphysenfuge und am Schaft des Metaphysenausgangs anzutreffen. Die Metaphyse läßt bereits eine beträchtliche Verdichtung erkennen. x 13.

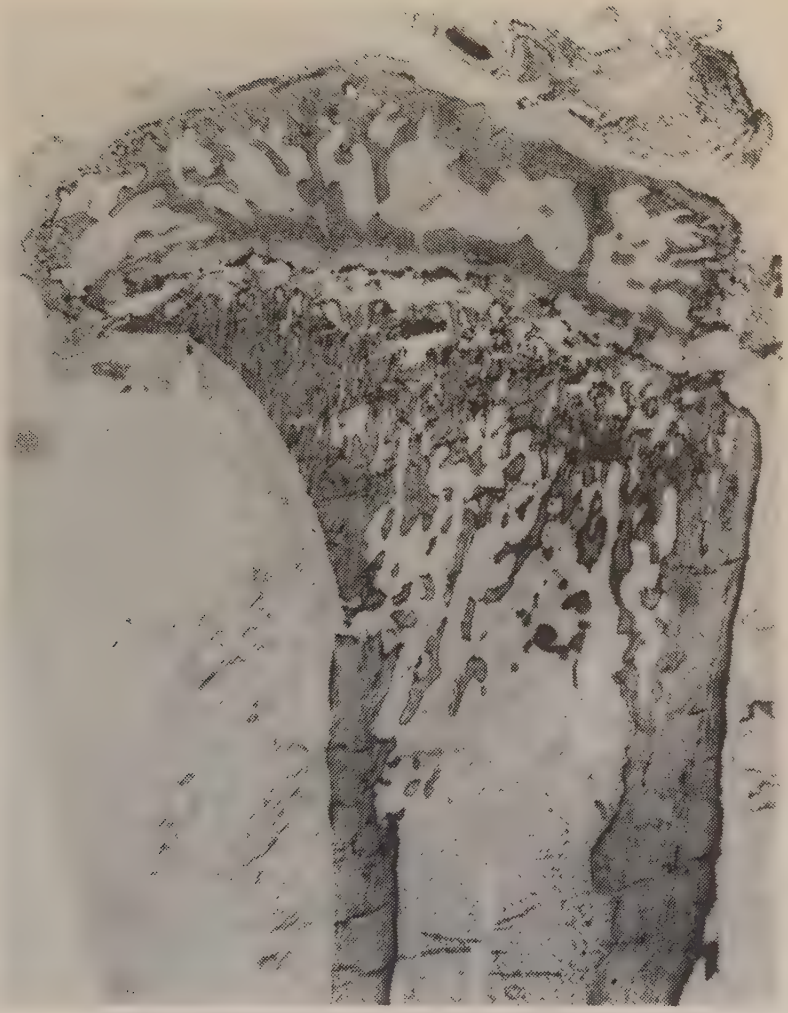


Abb. 17. Frontosagittaler Schnitt durch die bestrahlte Tibia, 9 Wochen p.irr. (Versuch A). Ausgeprägte Sklerosierung der Spongiosa und Compacta. In der medialen Hälfte der Metaphyse (links) sind erste Ansätze zu einem Umbau der Spongiosa mit Wiederaufnahme der Knochenapposition zu erkennen. Periostale Knochenauflagerung an der medialen Compacta bis zur Epiphysenfuge. x 13.

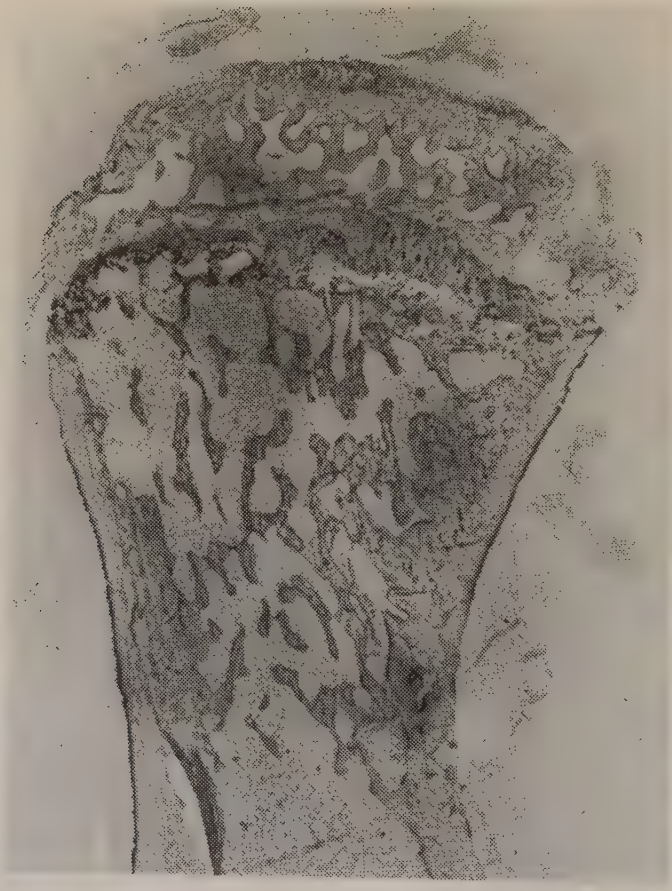


Abb. 18. Tibia, 9 Wochen p.irr. (Versuch A). Der Schnitt verläuft vorwiegend durch die mediale Hälfte der Tibiametaphyse, in der die Reparation weit fortgeschritten ist. Die bereits umgebaute Spongiosa ist nur vereinzelt mit Anbausäumen besetzt. Durchgehende periostale Knochenauflagerung an beiden Compactae. x 8

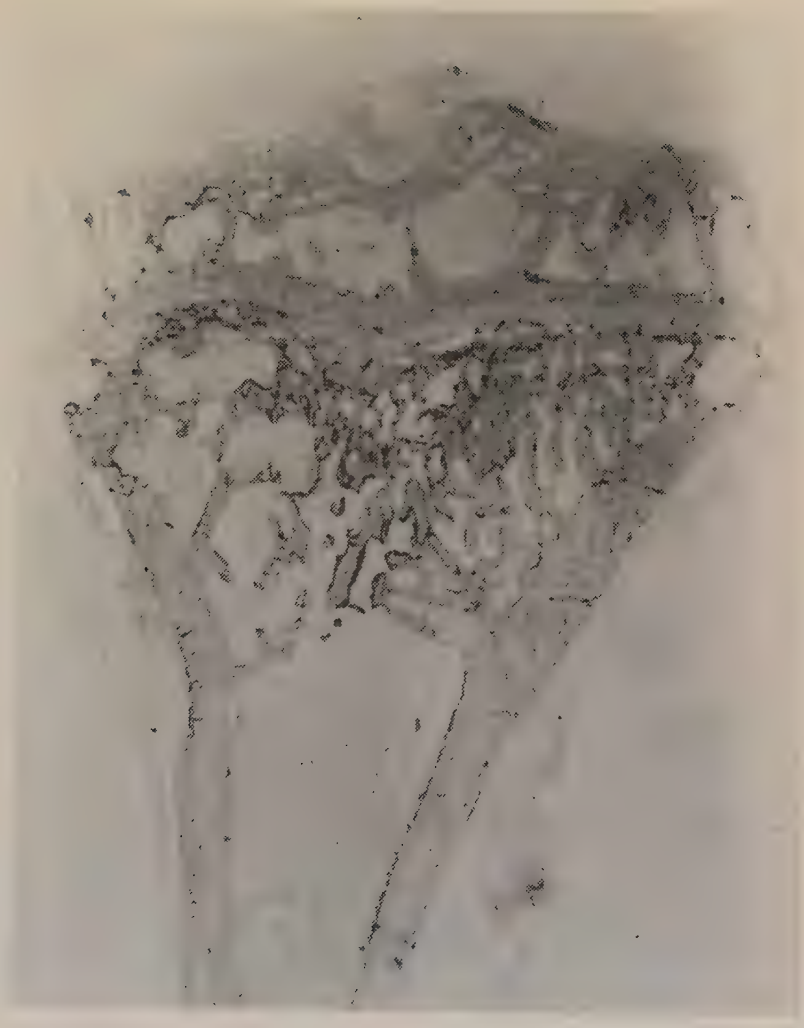


Abb. 19. Tibia, 12 Wochen p.irr. (Versuch A). Im medialen und lateralen Teil der Metaphyse haben sich Reparationsprozesse weitgehend durchgesetzt, während in der Mitte noch ein großer sklerotischer Herd besteht. An der Grenze zur um gebauten Spongiosa kommen hier mehrere intensive Schwärzungsbezirke vor. x 11.5.

Abb. 2o. Autoradiogramm der unbestrahlten Tibia, 2 Wochen nach Injektion von ^{45}Ca (Versuch B). Das ursprüngliche Markierungsmuster (siehe Abb. 5) ist durch das Wachstum des Knochens verschoben und teilweise eliminiert. Neu entstanden ist der zwischen den markierten Knorpelresten (Pfeil)und der Epiphysenfuge gelegene Metaphysenabschnitt. x 8.5.

Abb. 21. Unbestrahlte Tibia, 4 Wochen nach Injektion von ^{45}Ca (Versuch B). Durch das Wachstum der Epiphysenfuge hat sich der Abstand zu den markierten Knorpelresten weiter vergrößert. Einige markierte Trabekel befinden sich noch am Metaphysenausgang, zumeist eingebaut in die Compacta. x 8.

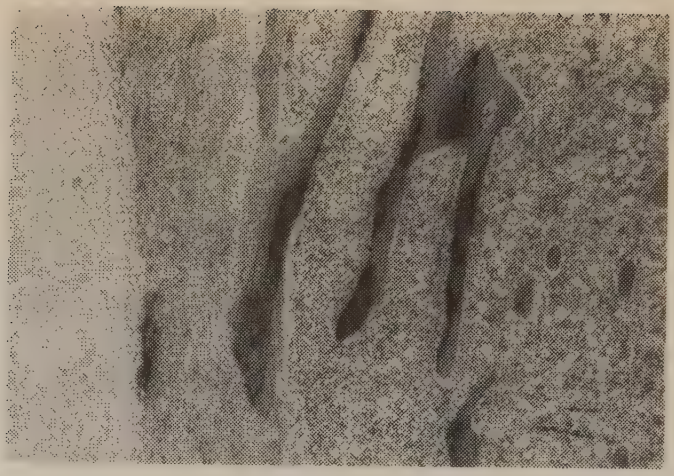


Abb. 22. Ausschnitt vom Metaphysenausgang der unbestrahlten Tibia, 4 Wochen p.inj. (Versuch B). In Schaftnähe gelegene markierte Trabekel werden allmählich in die Compacta eingemauert. x 41.

Abb. 23. Ausschnitt aus der unbestrahlten Femurepiphyse, 4 Wochen p.inj. (Versuch B). Vor und nach Injektion gebildete Trabekelteile lassen sich durch die Lage der Schwärzungssäume unterscheiden (neue Teile umrandet). Der Anteil des neugebildeten Knochens beträgt hier ca. 27 %. x 55.

Abb. 24. Tibia, 1 Woche nach Bestrahlung und Injektion von ^{45}Ca (Versuch B). Die neugebildete Spongiosazone zwischen den markierten Knorpelresten und der Epiphysenfuge entspricht dem Längenzuwachs des Knochens (900 µ gegenüber 1600 µ auf der unbestrahlten Seite). An der markierten Spongiosa nur geringfügige Anzeichen von Resorption. Der Pfeil markiert die Austrittstelle der endostalen Schaftmarkierung in der lateralen Compacta. x 10.

Abb. 25. Tibia, 4 Wochen p.irr. und inj. (Versuch B). Das Markierungsmuster der Metaphysenspongiosa bietet annähernd das gleiche Bild wie in der 1. Woche nach Bestrahlung. Ein weiterer Längenzuwachs hat nicht stattgefunden. x 9.

Abb. 26. Tibia, 6 Wochen p.irr. und inj. (Versuch B). Der Pfeil weist auf den Austrittspunkt der endostalen Schaftmarkierung in der lateralen Compacta. Mit zunehmender Verlagerung der Compacta nach innen wandert dieser Punkt von der 1. zur 6. Woche p.irr. immer weiter nach distal (siehe Abb. 24 bis 26). x 9.

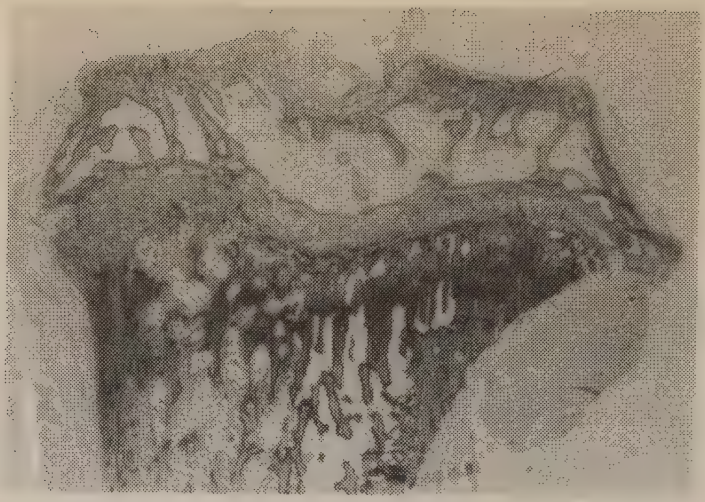


Abb. 27. Epimetaphyse der bestrahlten Tibia, 9 Wochen p.irr. und inj. (Versuch B). Im lateralen Teil der Metaphyse noch alte sklerotische Spongiosa, medial auf dem Boden der Markregeneration bereits deutlicher Spongiosaumbau. x lo.

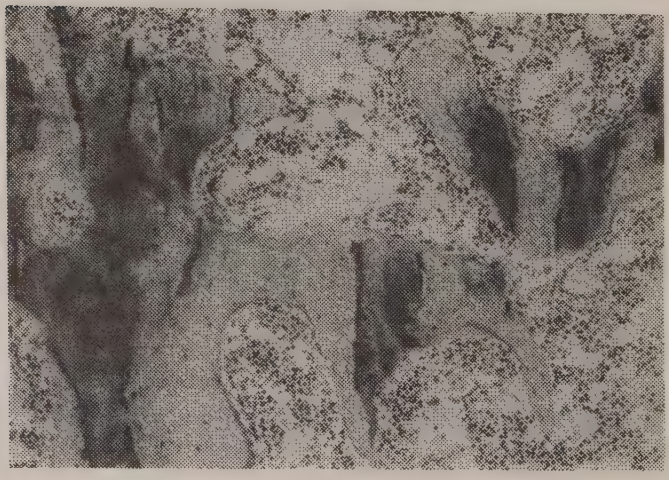


Abb. 28. Ausschnitt aus Abb. 27. Zentral in den neuen Trabekeln finden sich markierte Reste der alten Spongiosa, eingefaßt von basophilen Auflagerungen und regulärem Knochengewebe. x lo5.

Abb. 29. Femur, 4 Wochen p.irr. und inj. (Versuch B). Wie in der Tibia kein weiterer Längenzuwachs des Knochens nach der 1. Woche p.irr. und keine wesentlichen resorptiven Veränderungen an der markierten Spongiosa. Die Metaphysencompacta hat sich durch endostale Knochenauflagerung und Einbeziehung markierter Trabekel beträchtlich verdickt. x 10.5.

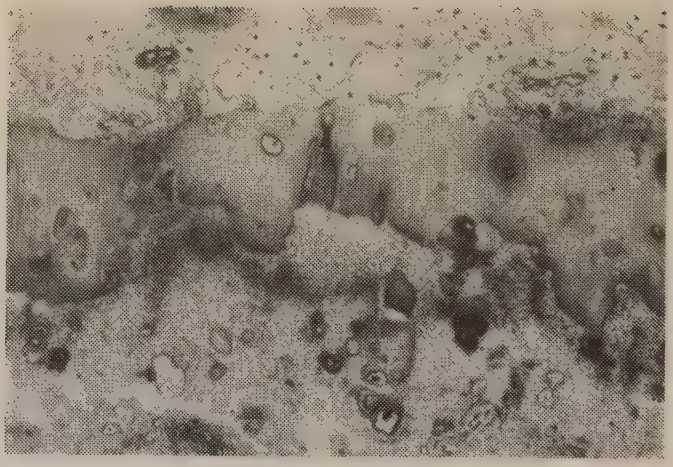
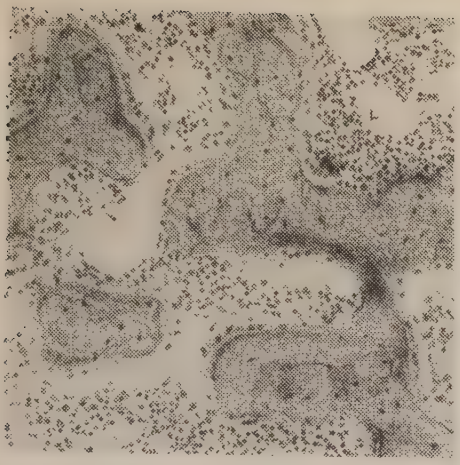


Abb. 3o. Tibiaepiphysenfuge einer Ratte, die 5 Wochen p.irr. markiert und 4 Wochen später getötet wurde. Der in Bildmitte verlaufende Schwärzungssaum wurde zum Zeitpunkt der Injektion als Verkalkungssaum an der Grenze des hyalinen Knorpels angelegt. Der verkalkte Knropel reicht fast bis zum unteren Bildrand. x 1o5.

Abb. 31. Gleiches Tier wie Abb. 3o, Ausschnitt aus der Metaphysencompacta des Femur. Markierte, mit Kittlinien begrenzte Areale, die durch Auffüllung kleiner Markräume und Gefäßkanäle in der 5. bis 9. Woche p.irr. entstanden sind. x 1o5.



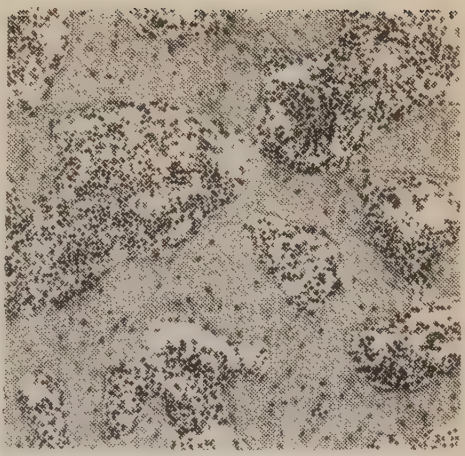


Abb. 32 und 33. Ausschnitt aus der bestrahlten (links) und unbestrahlten Patella, 3 Tage p.irr. (Inj. von ^{45}Ca 24 Std. vor der Tötung, Versuch D). Das Bild zeigt die typischen Markveränderungen und die Steigerung des Knochenanbaus in der bestrahlten Patella. Die gleiche Strahlenreaktion wird in der Epiphyse beobachtet. x 112.

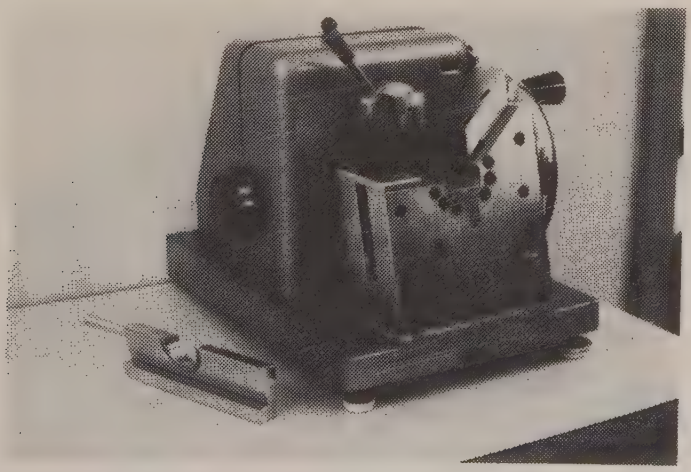


Abb. 34. Minot-Mikrotom 112o der Fa. Jung, mit selbstkonstruiertem Messerhalter und Objekthalter. Der eigentliche Messersupport ist herausgenommen; in seiner Rückseite (vorn) ist eine Nut mit Dichtungsgummi sichtbar.

Für die freundliche Überlassung des Themas und die großzügige Förderung meiner Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. med. O. H u g, Leiter des Strahlenbiologischen Institugs der Universität München und des Instituts für Biologie der GSF in Neuherberg, meinen herzlichen Dank sagen.

Mein besonderer Dank gilt des weiteren Herrn Prof. Dr. W. G ö s s n e r und seinem Mitarbeiter Herrn Dr. A. L u z, die durch nachhaltiges Interesse und sachkundigen Rat der Arbeit manche Anregung vermittelt haben. Aber auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Biologie möchte ich an dieser Stelle für die Gelegenheit zu fruchtbarer Diskussion meine herzliche Verbundenheit ausdrücken, ganz besonders Herrn Dr. W. M ü l l e r und Herrn U. L i n z n e r, die mich bei Durchführung der experimentellen Arbeiten im Isotopenlabor in entscheidender Weise unterstützt haben.

LEBENSLAUF

Am 5.3.1938 wurde ich als zweites Kind des Versicherungsangestellten Dr. Kurt Kummermehr und seiner Ehefrau Margarethe, geb. Mayerhofer, in München geboren.

1944 wurde ich zunächst in Weselberg/Kreis Pirmasens eingeschult, wo die Familie das letzte Kriegsjahr bei Verwandten verbrachte, und besuchte nach Kriegsende die Volksschule noch zwei weitere Jahre in München. 1947 trat ich in das Humanistische Gymnasium München-Pasing ein und legte dort im Juni 1956 das Abitur ab.

Im Wintersemester 1956/57 begann ich mein Hochschulstudium zunächst an der Technischen Hochschule München, wo ich ein Semester Physik hörte, das später als Fachsemester der Medizin angerechnet wurde. Vom Sommersemester 1957 an studierte ich Medizin und bestand im April 1959 im München das Physikum. Es folgten je ein klinisches Semester in Kiel, Wien und Basel und je zwei Semester in Berlin und München, bis ich im Dezember 1962 in München das Studium mit der Ärztlichen Prüfung abschloß. Von Februar 1963 an war ich als Medizinalassistent am Strahlenbiologischen Institut der Universität unter Leitung von Professor Hug mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation beschäftigt, deren experimentelle Arbeiten ausnahmslos im Institut für Biologie der Gesellschaft für Strahlenforschung in Neuherberg durchgeführt und hier im Frühjahr 1968 abgeschlossen wurden. Die klinische Ausbildung wurde im Juni 1968 an der I. Medizinischen Klinik der Universität München, dann am Zentralkrankenhaus Gauting der LVA Oberbayern fortgesetzt. Nach 4-monatiger Pause infolge einer Berufserkrankung vollendete ich im November 1969 die Medizinalassistentenzeit an der I. Frauenklinik der Universität München.

Nach Erteilung der Approbation im Januar 197o übernahm ich vorübergehend ärztliche Praxisvertretungen auf dem Land. Seit dem 1. Juni 197o bin ich als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle am Strahlenbiologischen Institut der Universität München tätig.